

Assoziierte Proteine und regulatorische Funktionen des CCAAT-
Bindekomplexes in *Aspergillus nidulans*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Master of Science (Biotechnologie) Katja Tuppatsch
geboren am 15.07.1985 in Hoyerswerda

Jena, September 2014

1. Gutachter: Prof. Dr. Axel Brakhage (Jena)
2. Gutachter: Prof. Dr. Erika Kothe (Jena)
3. Gutachter: Prof. Dr. Vera Meyer (Berlin)

Datum der öffentlichen Verteidigung: 12.12.2014

ZUSAMMENFASSUNG

Der CCAAT-Bindekomplex (CBC) ist ein globaler transkriptioneller Regulator in eukaryotischen Zellen. So wurden im humanen Genom Zelltyp-abhängig 5000-15000 CBC-Bindestellen identifiziert (Fleming *et al*, 2013). Der CBC besteht aus drei hochkonservierten Untereinheiten. Die entsprechenden Untereinheiten des Modellpilzes *Aspergillus nidulans* wurden HapB, HapC und HapE genannt. In den letzten Jahren wurden eine Reihe von CBC-regulierten Prozessen aufgeklärt und abhängige Gene identifiziert. Einen vertieften Einblick in die Funktionsweise des CBCs ergab die Strukturaufklärung des CBC/DNA-Komplexes.

Diese Arbeit liefert neue Erkenntnisse über CBC-regulierte Prozesse, CBC-assoziierte Proteine und dessen mögliche Rolle in der Positionierung von Nukleosomen und damit als Organisator von Promotoren.

Mittels Koimmunopräzipitation wurde ein neues, mit dem CBC-assoziiertes Protein unbekannter Funktion identifiziert, das als HapY bezeichnet wurde. Es handelt sich um ein für Ascomyceten spezifisches HMGA-ähnliches Protein mit der Lokusnummer AN8826. Mit seiner AT-hook-Domäne bindet es vermutlich spezifische CCAAT-Promotorbereiche, deren benachbarte Regionen AT-reich sind, wodurch die DNA-Bindungsaffinität des CBCs erhöht wird. Bisher ist ungeklärt, welche Gene durch den CBC/HapY-Komplex reguliert werden, denn eine Deletion des Gens zeigte unter den hier getesteten Bedingungen keinerlei Effekte. Bimolekulare Fluoreszenz Komplementationsanalysen bestätigen eine *in vivo*-Interaktion zwischen dem CBC und HapY. *In vitro* Protein-Protein- bzw. Protein-DNA-Interaktionsstudien waren aufgrund der ergebnislosen Reinigung des Proteins bisher nicht möglich. Ferner assoziiert ein geringer Anteil des CBCs mit allen vier Kernhistonen H2A, H2B, H3 und H4. Dies führt zu der Hypothese, dass der CBC unter bestimmten Umständen in der Lage ist, ein H2A/H2B-Dimer zu ersetzen und mit den anderen Histonen ein aufgeweitetes Nukleosom zu bilden. Eine Interaktion des CBC mit der Histon-Acetyltransferase GcnE konnte für *A. nidulans* weder *in vitro* noch *in vivo* nachgewiesen werden, obwohl die Phänotypen der Deletionsmutanten von *gcnE* und *hapC* identisch sind.

Zudem wurden in dieser Arbeit vergleichende Proteomanalysen durchgeführt, um den Einfluss der Inaktivierung des CBCs auf das Proteom von *A. nidulans* zu untersuchen. Als Grundlage für die Proteomstudien wurde erstmals eine Proteomkarte des Myzels von *A. nidulans* erstellt. 35 differentiell synthetisierte Proteine spiegeln die phänotypischen Eigenschaften der Δ *hapC*-Mutante wider, welche Defekte in Wachstum und Entwicklung aufweist und sensitiv gegen oxidativen Stress ist. Außerdem ist die Energiegewinnung des

Pilzes reduziert und es gibt Hinweise auf ein CBC-reguliertes Sekundärmetabolit-Gencluster. Die Expression der meisten Gene des Clusters in der $\Delta hapC$ -Mutante konnte bestätigt werden, jedoch konnte im Kulturüberstand dessen mögliches Produkt bisher nicht nachgewiesen werden.

SUMMARY

The CCAAT-binding complex (CBC) is a global transcriptional regulator of eukaryotic cells. CBC is supposed to regulate hundreds or even thousand of genes. The core of the complex consists of three highly conserved subunits, called HapB, HapC and HapE in the ascomycete *Aspergillus nidulans*.

In recent years novel findings were generated about the assembly of the CBC subunits. Especially the crystal structure of the CBC/DNA complex yielded deeper insight in the functionality of the complex.

This work provides additional knowledge about CBC-regulated processes, CBC associated proteins and it's possible functionality in nucleosome positioning and promoter organisation.

Using coimmunoprecipitation, a novel CBC associated protein with unknown function was isolated from *A. nidulans*. The protein was named HapY. This HMGA-like protein is encoded by AN8826 and is specific for ascomycetes. The protein contains an AT-hook domain and is supposed to bind to AT-rich neighboring regions within CCAAT containing promoters to increase the CBC binding affinity to DNA. It is still unknown what kind of genes are regulated by the CBC/HapY complex because a deletion of the gene did not show any phenotypic effect under the tested conditions. Bimolecular fluorescence complementation studies confirmed an *in vivo* interaction between CBC and HapY. Due to the unusual solubility behaviour of the recombinant protein, *in vitro* studies could not be performed until now. A small fraction of CBC interacts with the four core histones H2A, H2B, H3 and H4. This leads to the hypothesis that the CBC is able to exchange an H2A/H2B dimer to form an instable nucleosome with the remaining histones. By contrast, no interaction could be detected between the CBC and the histone acetyltransferase GcnE either *in vivo* nor *in vitro*.

Moreover, the consequence of a CBC inactivation was investigated by a comparative proteomic approach. As a basis for this proteome studies for the first time a detailed proteome reference map of *A. nidulans* mycelia was generated. 35 differentially formed abundant proteins reflect the phenotype of the *hapC* deletion mutant. Furthermore, there is evidence for a secondary metabolite gene cluster that is regulated by the CBC. The expression of almost all cluster genes could be confirmed but no natural product derived from this cluster was detected in the culture supernatant, yet.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematischer Vergleich der Domänen von H2A, H2B, H3, H4 und den CBC-Untereinheiten (Huber <i>et al</i> , 2012).....	4
Abbildung 2 (A) Struktur des CBC:DNA-Komplexes. (B) Strukturelle Überlagerung des CBCs mit der ersten DNA-Windung eines Nukleosoms (Huber <i>et al</i> , 2012).	4
Abbildung 3: Modell des Redox-regulierten CCAAT-Bindekomplexes.....	5
Abbildung 4: Schematische Darstellung der <i>hapC</i> -Deletion in <i>A. nidulans</i> RMSO11 (Wildtyp) (A) und die dazu gehörige Southern Blot-Analyse (B).....	34
Abbildung 5: Phänotypische Charakterisierung der $\Delta hapC$ -Mutante.....	35
Abbildung 6: Standard-Plasmide für eine C-terminale (A) und eine N-terminale Venus-Fusion (B).	36
Abbildung 7: Schematische Darstellung der zielgerichteten Integration des Plasmids <i>phapCVenus-ptrA</i> in das Genom der $\Delta hapC$ -Mutante (A) mit zugehöriger Southern Blot- (B) und Northern Blot-Analyse (C).....	37
Abbildung 8: Phänotyp der <i>hapC</i> -Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (A) und Lokalisation von HapC ^{Venus} (B).....	38
Abbildung 9: Mikroskopische Analyse der Zellkernisolation. Nach der Isolation der Zellkerne aus dem Wildtyp RMSO11 ArgB ⁺ und der <i>hapC</i> ^{Venus} -Komplementationsmutante wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt.....	39
Abbildung 10: SDS-PAGE (A) und Western Blot-Analyse (B) der koimmunoprecipitierten Kernextrakte.....	40
Abbildung 11: Aminosäuresequenzanalyse von HapY.....	41
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Deletion von <i>hapY</i> in <i>A. nidulans</i> A1153 (A) und die dazu gehörige Southern Blot-Analyse (B).	42
Abbildung 13: Phänotyp von $\Delta hapY$	42
Abbildung 14: Schematische Darstellung der zielgerichteten Integration des mit <i>HindIII</i> linearisierten <i>pHapYVenus-pyroA</i> Plasmids in das Genom der $\Delta hapY$ -Mutante (A) mit zugehöriger Southern Blot-Analyse (B).....	43
Abbildung 15: Lokalisation von HapY ^{Venus} . Mikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung 63-fach) des Wildtyps (A1153 ArgB ⁺) und der <i>hapY</i> ^{Venus} -Komplementation.....	44
Abbildung 16: Mutanten für die Bimolekulare Fluoreszenz Komplementationsanalyse.	45
Abbildung 17: <i>In vivo</i> Protein-Protein-Interaktion mittels Bimolekularer Fluoreszenz Komplementations-Analyse.....	46
Abbildung 18: Aufreinigung des rekombinant hergestellten Proteins HapY.	47
Abbildung 19: Phänotypische Charakterisierung der $\Delta gcnE$ -Mutante.	48
Abbildung 20: Southern Blot-Analyse der <i>gcnE</i> -Mutanten und Lokalisation von GcnE.....	50
Abbildung 21: Aufreinigung des rekombinanten Proteins GcnE.....	52
Abbildung 22: Vergleichende Sequenzanalyse von HapC und dem Homolog NF-YB.	53

Abbildung 23: Phänotypische Charakterisierung der Deletionsmutante $\Delta ubcH$ (AN8258) und der $hapCK129R^{Venus}$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp (WT), $\Delta zu hapC$, $\Delta gcnE$ und der $hapC^{Venus}$ -Mutante.	55
Abbildung 24: Myzeliale Proteomekarte von <i>A. nidulans</i> kultiviert in AMM mit Glutamin als einziger Stickstoffquelle.	58
Abbildung 25: 2D-Gel (pH 3-11 NL) von <i>A. nidulans</i> Wildtyp TN02A7 versus $\Delta hapC$ -Mutante Nat24.	60
Abbildung 26: Northern Blot-Analyse der durch Kokultivierung von <i>A. nidulans</i> mit <i>S. rapamycinicus</i> induzierten Gene (grau und schwarz markierte Pfeile) vergleichend in <i>A. nidulans</i> Wildtyp (WT) und $\Delta hapC$ -Mutante (Δ).	63
Abbildung 27: HPLC Profil der Kulturüberstände von <i>A. nidulans</i> Wildtyp (schwarz) und $\Delta hapC$ -Mutante (blau).	64
Abbildung 28: Modell möglicher Regulationsmechanismen des CBC.	67

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: CBC-regulierte Gene in <i>A. nidulans</i>	6
Tabelle 2: Verwendete Bakterien- und Pilzstämmen	15
Tabelle 3: Anzuchtmedien für <i>E. coli</i> und <i>A. nidulans</i>	16
Tabelle 4: Zusätze zu Anzuchtmedien von <i>E. coli</i> und <i>A. nidulans</i>	17
Tabelle 5: Verwendete Plasmide	17
Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide	18
Tabelle 7: Verwendete Antikörper	20
Tabelle 8: ^{a)} Proteinnummer in Abbildung 24, ^{b)} Regulation: +/- bezieht sich auf die durchschnittliche Volumenänderung der Proteinpunkte im <i>hapC</i> -Proteom verglichen zum Wildtyp (statistische Analyse der Refraction-2D Gele mit der Delta2D-4.2 Software)	61
Tabelle 9: Protein Informationen zu allen identifizierten Proteinpunkten der myzelialen Proteomkarte von <i>A. nidulans</i> Wildtyp. ^{a)} Protein-Nummer in	87

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
SUMMARY	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VI
INHALTSVERZEICHNIS.....	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
EINLEITUNG	1
1 <i>Aspergillus nidulans</i> – Modellorganismus für filamentöse Pilze.....	1
2 Der eukaryotische CCAAT-Bindekomplex (CBC).....	2
2.1 Struktur des CBCs und von dessen Untereinheiten.....	3
2.2 Regulation der CBC-Assemblierung und Lokalisation	4
2.3 CBC-regulierte Gene	5
2.4 Durch den CBC-vermittelte Regulationsmechanismen.....	7
3 Chromatin und dessen Einfluss auf die Genregulation	8
3.1 Chromatin – Struktur und Funktion	8
3.2 Histonvarianten.....	10
3.3 Histonmodifikationen	11
4 Ziele dieser Arbeit	13
MATERIAL & METHODEN.....	15
1 Stämme und Materialien.....	15
1.1 <i>Escherichia coli</i> - und <i>Aspergillus nidulans</i> -Stämme	15
1.2 Medien und Zusätze.....	16
1.3 Plasmide	17
1.4 Oligonukleotide	18
1.5 Antikörper.....	20
2 Kultivierung von Mikroorganismen	20
2.1 Stammkulturen	20
2.2 Flüssigkultivierung	20
2.3 Tropfplattensensitivitätstest.....	20
2.4 Bestimmung der Feuchtbiomasse aus Flüssigkulturen.....	21
2.5 Bestimmung des Glukoseverbrauchs in Flüssigkulturen.....	21
3 Molekularbiologische Methoden.....	21
3.1 Klonierung und <i>in vitro</i> enzymatische Modifizierung von DNA.....	21
3.2 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	21
3.3 Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	21
3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22

3.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	22
3.6	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>A. nidulans</i> und Southern-Hybridisierung.....	22
3.7	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>A. nidulans</i> und Northern Blot-Analyse.....	23
3.8	Transformation von <i>A. nidulans</i>	23
4	Biochemische Methoden	24
4.1	Zellkernisolierung aus <i>A. nidulans</i> mit anschließender Protein Extraktion und Koimmunopräzipitation.....	24
4.2	Heterologe Produktion und Isolation von Proteinen aus <i>E. coli</i>	24
4.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	25
4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
4.5	Western Blot	26
4.6	2D-Gelelektrophorese.....	26
4.7	Flüssigverdau von Proteinen	29
5	Analytische Methoden	29
5.1	„High-Performance Liquid Chromatography“(HPLC)-Analysen	29
5.2	LC-MS/MS-Bestimmung	29
5.3	Proteinreinigung mittels ÄKTA	31
6	Mikroskopie.....	32
7	Datenbanken	32
	ERGEBNISSE.....	33
1	Analyse auf mögliche Interaktionspartner des CBC	33
1.1	Deletion von <i>hapC</i> und phänotypische Charakterisierung der Mutante.....	33
1.2	Komplementation der $\Delta hapC$ -Mutante und Lokalisationsstudien zu HapC	35
1.3	Zellkernisolierung und Koimmunopräzipitation von HapC ^{Venus}	38
1.4	Deletion eines potentiellen CBC-Bindungspartners und Charakterisierung der Mutante.....	40
1.5	Komplementation der $\Delta hapY$ Mutante und Lokalisationsstudien	42
1.6	Visualisierung der Interaktion zwischen HapC und HapY in <i>A. nidulans</i>	44
1.7	Heterologe Expression des <i>A. nidulans hapY</i> in <i>E. coli</i> und Proteinreinigung	46
2	Regulation des CBC	47
2.1	Deletion von <i>gcnE</i> und Charakterisierung der Mutante	48
2.2	Komplementation der $\Delta gcnE$ -Mutante und Lokalisationsstudien.....	49
2.3	<i>In vivo</i> Interaktionsstudien zwischen HapC und GcnE in <i>A. nidulans</i>	50
2.4	Heterologe Expression des <i>A. nidulans gcnE</i> in <i>E. coli</i> und Proteinreinigung	51
2.5	Potentielle Stellen für post-translationale Modifikationen in HapC	53
3	Proteomanalyse zur Identifizierung von CBC-regulierten Proteinen.....	56
3.1	Erstellung einer detaillierten Proteomkarte von <i>A. nidulans</i>	56
3.2	Vergleichende Proteomanalysen von <i>A. nidulans</i> Wildtyp mit der $\Delta hapC$ -Mutante.....	59

3.3 Einfluss des CBCs auf das DHMBA Sekundärmetabolitgencluster	62
DISKUSSION	65
1 Interaktion vom CBC mit Proteinen unbekannter Funktion.....	65
2 Rolle des CBCs bei der Nukleosomen Positionierung.....	68
3 Der CBC und post-translationale Modifikationen.....	69
4 Einfluss des CBCs auf den Sekundärmetabolismus	71
5 Proteom-Analysen von <i>A. nidulans</i>	72
REFERENZEN	75
ANHANG.....	87
LISTE DER WISSENSCHAFTLICHEN PUBLIKATIONEN UND VORTRÄGE	XI
LEBENS LAUF	XIII
DANKSAGUNG.....	XIV
EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	XV

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>A.</i>	<i>Aspergillus</i>	mRNA	messenger RNA
AMM	<i>Aspergillus</i> -Minimal-Medium	MS	Massenspektrometrie
Amp	Ampicillin	MW	<i>molecular weight</i>
AVM	<i>Aspergillus</i> -Voll-Medium	n	Nano
APS	Ammoniumpersulfat	NLS	<i>nuclear localization sequence</i>
bp	Basenpaar	NRPS	Nicht-ribosomale Peptidsynthetase
BPS	bathophenanthroline disulfonic acid	ORF	<i>open reading frame</i>
bzw.	beziehungsweise	p	Plasmid
CBC	CCAAT <i>binding complex</i>	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
cDNA	komplementäre DNA	PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
Δ	Deletion	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
DHMBA	2,4-Dihydroxy-3-Methyl-6-(2- Oxopropyl)-Benzaldehyd	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
DNA	Desoxyribonukleinsäure	pI	isoelektrischer Punkt
d. h.	das heißt	PONDR	Predictor of natural disordered regions
dNTPs	Desoxyribonucleotidtriphosphate	^R	Resistenz
DTT	Dithiothreitol	RDI	Rho GTP Dissoziationsinhibitor
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>	RNA	Ribonukleinsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>	RNase	Ribonuklease
<i>et al.</i>	und andere	ROS	<i>reactive oxygen species</i>
Fe	Ferrum (Eisen)	rRNA	ribosomale RNA
g	Gramm	RT	Raumtemperatur
°C	Grad Celsius	rpm	Umdrehungen pro Minute
h	Stunde	<i>S.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Hap	<i>heme activating protein</i>	<i>S.</i>	<i>Streptomyces rapamycinicus</i>
HFM	<i>histone fold motif</i>	SDS	<i>sodium dedecyl sulfate</i>
His-Tag	Histidin-Tag	SV	Säulenvolumen
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>	TCA	Trichloressigsäure
IEF	isoelektrische Fokussierung	TEV	Tobacco Etch Virus
IPG	immobilized pH gradient	U	Unit
Kan	Kanamycin	<i>U.</i>	<i>Ustilago</i>
kDa	Kilodalton	ÜN	über Nacht
kbp	Kilobasenpaar	v/v	Volumen pro Volumen
l	Liter	WT	Wildtyp
LB	<i>lysogeny broth</i>	w/v	Masse pro Volumen
M	Molar	%	Prozent
m	Milli	z. B.	zum Beispiel
NF-Y	<i>nuclear factor Y</i>		
μ	Mikro		
MBP	Maltose Bindeprotein		
min	Minute		

EINLEITUNG

1 *Aspergillus nidulans* – Modellorganismus für filamentöse Pilze

Der filamentöswachsende Schimmelpilz *Aspergillus nidulans* ist ein Vertreter der Gattung *Aspergillus*, welche 1729 erstmals durch den italienischen Priester P.A. Micheli beschrieben wurde (Micheli, 1729). Bis heute sind über 250 Arten der Gattung bekannt (Geiser *et al*, 2007), die ubiquitär vorkommen. Der lateinische Name *Aspergillus* beschreibt das morphologische Aussehen der Sporenträger des Pilzes, die an einen Weihwasserwedel (Aspergill) erinnern. Der Artname leitet sich von der Morphologie des sexuellen Fruchtkörpers ab (“nidulans”= der Nistende). Taxonomisch werden *Aspergilli* aufgrund ihrer charakteristischen Fortpflanzungsstrukturen, den schlauchförmigen Asci, der Klasse der Ascomyceten zugeordnet. Die Fruchtkörper der sexuellen Entwicklung werden Kleistothecien genannt, welche eine Größe von 100 – 200 µM haben und von sogenannten Hülle-Zellen umschlossen sind (Doby & Kombila-Favry, 1978). Hinsichtlich des sexuellen Lebenszyklus ist der wissenschaftlich korrekte Name *Emmericella nidulans* (Samson, 1994). Dieser hat sich jedoch in Neuveröffentlichungen nicht durchgesetzt, weshalb weiterhin der traditionelle Name *Aspergillus nidulans* verwendet wird.

Neben dem sexuellen Lebenszyklus kann sich *A. nidulans* auf asexuellem Weg fortpflanzen. Der Träger der asexuellen Sporen (Konidien) heißt Konidiophor. Das Konidiophor besteht aus verschiedenen Zelltypen. Nach der Auskeimung haploider Sporen bilden sich Hyphen. Das Konidiophor bildet sich senkrecht aus einer Fußzelle, die am Ende anschwillt. Dort bilden sich wiederum die Metulae, aus denen die Phialiden hervorgehen. Die Phialiden produzieren die Konidien, die kettenartig in einer Reihe angeordnet sind (Adams *et al*, 1998). *A. nidulans* besitzt diverse Eigenschaften, die ihn als Modellorganismus für eukaryotische Zellen interessant machen. Er zeichnet sich durch seine leichte Kultivierbarkeit in einfachen Minimalmedien ohne anspruchsvolle Substrate und durch seine relativ kurze Entwicklungszeit von nur 48 h aus. In den 50iger Jahren wurde *A. nidulans* speziell für genetische Fragestellungen etabliert (Pontecorvo *et al*, 1953). Seit dem wurden umfangreiche Erkenntnisse zu genetischen und metabolischen Regulationen, Entwicklung, Zellzykluskontrolle, Zellpolarität und Chromatinstruktur des Pilzes gewonnen, welche auf pathogene (*A. fumigatus*, *A. terreus*) oder industriell verwertbare Pilze (*A. niger*, *A. oryzae*) oder sogar höhere Eukaryoten transferiert werden können. Sein effektives Sekretionssystem ermöglicht die Nutzung von *A. nidulans* für die Produktion rekombinanter Proteine (Kinghorn

& Unkles, 1994). Des Weiteren produziert *A. nidulans*, wie auch andere *Aspergillus* Spezies, eine Reihe interessanter Naturstoffe, wie beispielsweise Penicillin. Die molekulare Regulation der Biosynthese dieses Sekundärmetaboliten wurde ausführlich in *A. nidulans* studiert (Brakhage *et al*, 2005; Brakhage *et al*, 2004). Eine Genom-Analyse von *A. nidulans* zeigte eine Reihe von sogenannten stillen Genclustern, deren Gene nur unter bestimmten Bedingungen exprimiert werden und deren Proteinprodukte möglicherweise an der Bildung interessanter Naturstoffe beteiligt sind (Bok *et al*, 2006; Brakhage *et al*, 2008). Durch die Überexpression eines Transkriptionsaktivators konnte erstmals solch ein stilles Gencluster aktiviert und ein zugehöriges Naturprodukt isoliert werden (Bergmann *et al*, 2007). Ein weiteres stilles Gencluster konnte durch die Kokultivierung von *A. nidulans* mit *Streptomyces rapamycinicus* aktiviert werden (Schroeckh *et al*, 2009).

2 Der eukaryotische CCAAT-Bindekomplex (CBC)

Die CCAAT-Box ist eines der am häufigsten vorkommenden *cis*-Elemente in den Promotor-Regionen von eukaryotischen Genen. Dies wurde in einer statistischen Analyse von über 500 Promotoren bestätigt (Bucher, 1990). Das Pentanukleotid innerhalb der Konsensussequenz C Pu Pu CCAAT C/G A/G G A/C G befindet sich in der Regel in 5' oder 3' Orientierung zwischen -60 und -200 Basenpaaren stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts (Bucher & Trifonov, 1988). Verschiedene DNA-bindende Proteine, die mit der CCAAT-Sequenz interagieren, wurden über die Jahre gefunden. Die Bindung der exakten Konsensussequenz bestätigte sich jedoch nur für die NF-Y (*nuclear factor Y*)/Hap (*heme activating protein*) Familie (Mantovani, 1998). Dieser Familie zugehörige Faktoren wurden in einer Reihe von Organismen entdeckt und als Hap Komplex (*Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, and *Aspergillus* Spezies) bzw. NF-Y (*Xenopus* und Säugetieren) bezeichnet. Der Hap Komplex aus *S. cerevisiae* war der zuerst charakterisierte Komplex aus dieser Familie (Forsburg & Guarente, 1989; Olesen *et al*, 1987; Pinkham *et al*, 1987). Der Komplex besteht aus den vier Untereinheiten Hap2p, Hap3p, Hap4p und Hap5p, wobei nur drei Untereinheiten für die DNA-Bindung notwendig sind (Hap2p, Hap3p, Hap5p). Hap4p ist in die transkriptionelle Aktivierung des Komplexes involviert (Forsburg & Guarente, 1989; McNabb *et al*, 1995). Im Gegensatz dazu besteht der NF-Y-Komplex aus Säugetieren nur aus drei Untereinheiten, NF-YA, NF-YB und NF-YC, welche homolog zu Hap2p, Hap3p und Hap5p sind. Es wurde kein Hap4p-Homolog identifiziert, d. h. drei Untereinheiten sind für die DNA-Bindung und die transkriptionelle Aktivierung in Säugetieren ausreichend (Kato, 2005). Ebenso wurden in *Aspergillus* Spezies zunächst nur die drei Homologen HapB/NF-YA,

HapC/NF-YB und HapE/NF-YC identifiziert (Steidl *et al*, 1999). Wenige Jahre später wurde mittels Yeast-two-hybrid-Analyse ein weiterer Interaktionspartner des CBCs in *A. nidulans* gefunden, der HapX genannt wurde (Tanaka *et al*, 2002). Die Deletion des Gens *hapX* führte unter normalen Bedingungen nicht zu dem bekannten Wachstums- und Sporulationsdefekt von Hap-Mutanten (Steidl *et al*, 1999). Nachfolgende Studien identifizierten HapX als Eisenregulator, dessen Interaktion mit dem CBC insbesondere für Eisen-abhängige Wege erforderlich ist (Hortschansky *et al*, 2007). Die Protein-Protein-Interaktion zwischen den Hap-Untereinheiten ist evolutiv hoch konserviert, denn es wurde gezeigt, dass sich die Untereinheiten aus verschiedenen Organismen funktionell komplementieren können (Becker *et al*, 1991; Tüncher *et al*, 2005). So konnte beispielsweise ein DNA-Komplex aus rekombinant hergestelltem HapC aus *A. nidulans* und Hap2p und Hap5p aus *S. cerevisiae* erfolgreich rekonstituiert werden (Kato *et al*, 1998). Doch nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* konnte die Funktionalität demonstriert werden. Jegliche Hap-Deletionsmutanten in *A. nidulans* konnten mit dem korrespondierenden Gen aus *A. oryzae* komplementiert werden (Tanaka *et al*, 2001).

2.1 Struktur des CBCs und von dessen Untereinheiten

Für die DNA-Bindung bzw. Untereinheiten-Interaktion besitzt jede Untereinheit des CBCs eine hochkonservierte Domäne. Das *histone fold motif* (HFM) von HapC und HapE zeigt 75 % Sequenz-Ähnlichkeit zu den menschlichen Homologen NF-YB und NF-YC. Analog zu Histonen wird das HFM für die Heterodimerisierung der Untereinheiten benötigt. Die Tertiärstruktur des HFMs der beiden Untereinheiten beinhaltet drei α -Helices ($\alpha 1$ - $\alpha 3$), die durch zwei kurze Loop-Segmente (L1-L2) verknüpft sind. Analysen haben ergeben, dass HapC und HapE eine große Ähnlichkeit zu H2B und H2A aufweisen (Maity & de Crombrughe, 1998). Verglichen mit der Dali Datenbank konnten für HapB keine verwandten Proteindomänen gefunden werden (Holm & Rosenstrom, 2010). HapB besteht aus einer α N-Helix, die über einen Linker mit der Sensor Helix verbunden ist und einem C-terminalen Anker *loop*. Die Helices befinden sich in keiner festen Orientierung zueinander, wodurch HapB eine relativ lockere Struktur aufweist.

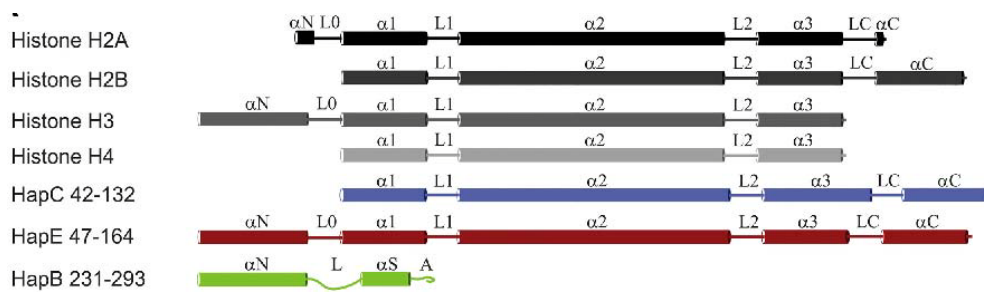


Abbildung 1: Schematischer Vergleich der Domänen von H2A, H2B, H3, H4 und den CBC-Untereinheiten (Huber *et al*, 2012).

Die freie CBC-Struktur hat sehr große Ähnlichkeit mit der Struktur des DNA-gebundenen CBCs. Demnach hat die DNA-Bindung keine gravierenden Strukturveränderungen des CBCs zur Folge. Der C-terminale Teil von HapB, welcher die DNA-Bindungsspezifität aufweist, zeigt in Abwesenheit von DNA eine ungeordnete Ausrichtung. Dieser Teil der Untereinheit sensiert die CCAAT-Box, integriert die αS-Helix in die kleine Furche der DNA und verankert damit den CBC fest in der Promotor-Region. Hingegen bindet das HapC/HapE-Dimer das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA in einer Nukleosomen-ähnlichen Weise. Die Struktur legt nahe, dass der CBC das Histon-Dimer H2A/H2B ersetzt und somit die Nukleosomenformation stört (Huber *et al*, 2012).

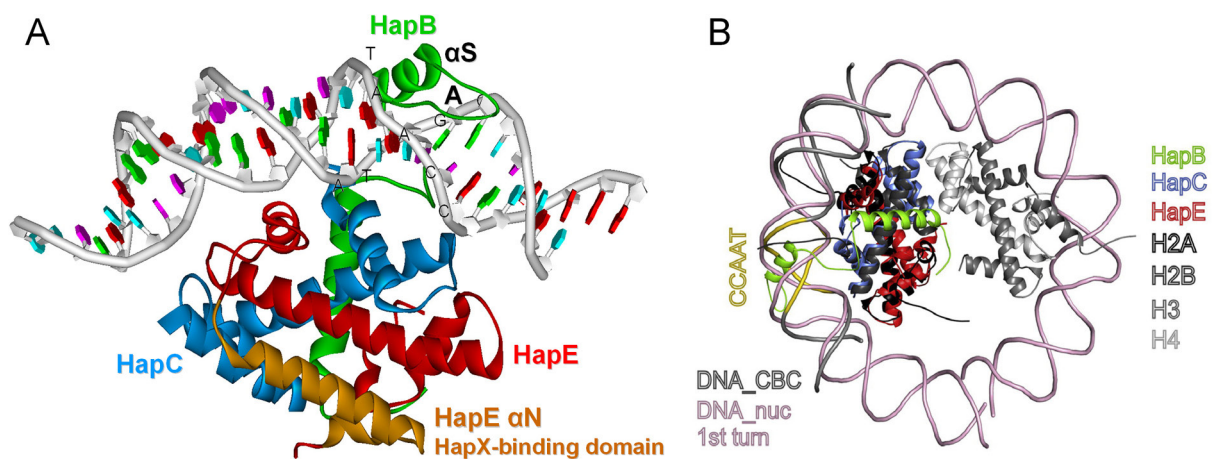


Abbildung 2 (A) Struktur des CBC:DNA-Komplexes. (B) Strukturelle Überlagerung des CBCs mit der ersten DNA-Windung eines Nukleosoms (Huber *et al*, 2012).

2.2 Regulation der CBC-Assemblierung und Lokalisation

Die Assemblierung des CBCs ist abhängig vom Redoxstatus der Zelle und wird auf post-translationaler Ebene reguliert. Der Redoxstatus wird über oxidative Modifikationen von zwei Thiol-Gruppen sensiert, die sich innerhalb des HFMs der Untereinheit HapC befinden. Eine Dimerisierung von HapC und HapE findet nur statt, wenn HapC in seiner reduzierten Form vorliegt. Andernfalls lokalisiert HapC im Zytoplasma und es kommt zum Abbau von HapE

(Kato *et al*, 2002). Oxidiertes HapC kann über das Thioredoxin-System (Thön *et al*, 2007) wieder reduziert werden. Die Formation des Heterodimers HapC/HapE erfolgt über die HFMs und ist essentiell für die Bildung des Trimers. HapB besitzt als einzige Untereinheit ein Kernlokalisierungssignal (NLS). Die Bindung von HapB an das Dimer führt über einen *piggy back* Mechanismus („huckepack“) zum Transport des Komplexes in den Zellkern (Steidl *et al*, 2004; Thön *et al*, 2010).

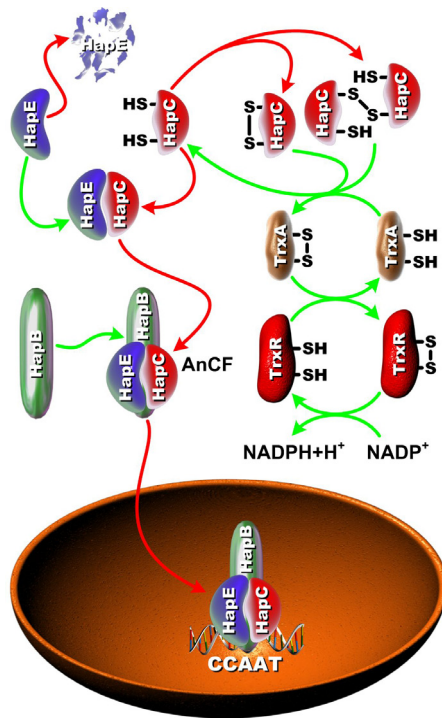


Abbildung 3: Modell des Redox-regulierten CCAAT-Bindekomplexes. Reduziertes HapC bildet mit HapE ein stabiles Heterodimer. Dieses wird durch die Untereinheit HapB, welche das Kernlokalisierungssignal trägt, erkannt. Anschließend wird der CBC über einen *piggy back* Mechanismus in den Kern transportiert. Oxidiertes HapC wird durch das Thioredoxinsystem wieder reaktiviert (modifiziert nach Thön *et al*, 2010).

2.3 CBC-regulierte Gene

Eine Vielzahl eukaryotischer Gene wird durch den CBC-reguliert, jedoch ist die Anzahl der bekannten Gene noch sehr gering (Bucher, 1990; Fleming *et al*, 2013). Darüber hinaus kann eine einheitliche organismen-übergreifende Aussage über CBC-regulierte Gengruppen nicht getroffen werden.

In *S. cerevisiae* wurde der Hap-Komplex als ein Regulator der Atmungskette identifiziert. Fast alle Gene der Atmungskette besitzen eine CCAAT-Box in ihrer Promotor-Region und werden durch den Hap-Komplex aktiviert (Buschlen *et al*, 2003). Im Gegensatz dazu reguliert der menschliche NF-Y-Komplex eine Vielzahl von Genen, die sich keiner übergeordneten Gruppe zuordnen lassen (Mantovani, 1999). Das gleiche trifft für den CBC von *A. nidulans* zu, dessen regulierte Gene an verschiedenen Prozessen beteiligt sind (zusammengefasst in Tabelle 1). Beispielsweise wird durch die CBC-vermittelte Genregulation der Sekundärmetabolismus und die oxidative Stressantwort des Pilzes koordiniert.

A. nidulans ist bekannt für die Produktion des Sekundärmetaboliten Penicillin. Die Gene des Penicillinclusters (*aataA*, *aataB*, *acvA* und *ipnA*), welche für die an der Biosynthese beteiligten Enzyme kodieren, haben alle eine CCAAT-Box in ihrer Promotorsequenz und werden durch den CBC reguliert (Litzka *et al*, 1996; Spröte *et al*, 2008; Then Bergh *et al*, 1996). Darüber hinaus reguliert der CBC das Acetamidasegen (*amdS*), welches der Pilz für den Verbrauch von Acetamid als alleinige Stickstoff- und Kohlenstoff-Quelle benötigt. Die Acetamidase hydrolysiert Acetamid zu Acetat und Ammonium. Eine Hap-Deletionsmutante ist daher kaum noch in der Lage auf Acetamid als Substrat zu wachsen (Littlejohn & Hynes, 1992; Papagiannopoulos *et al*, 1996). Aufgrund der CBC-abhängigen *gdhA*-Expression ist das Wachstum von Hap-Deletionsmutanten auf Nitrat als Stickstoffquelle stark gehemmt. Die Glutamat-Dehydrogenase (*gdhA*) katalysiert die Synthese von Glutamat aus Ammonium und α -Ketoglutarat, ein essentieller Schritt im Zellstoffwechsel. Ein weiterer Phänotyp von Hap-Deletionsmutanten ist das verschlechterte Wachstum bei Eisenmangel und Eisenüberschuss im Vergleich zum Wildtyp. Aus verschiedenen Studien geht hervor, dass der CBC im Komplex mit HapX ein essentieller Regulator des Eisenstoffwechsels ist. Zum Beispiel aktiviert der CBC/HapX-Komplex bei Eisenüberschuss das Gen *cccA*, welches für einen Transporter kodiert, der überschüssiges Eisen in Vakuolen speichert. In Hap-Deletionsmutanten ist dieser Prozess gestört, weshalb das Eisen toxisch auf die Zelle wirkt (Gsaller *et al*, 2012; Hortschansky *et al*, 2007). Die Untersuchungen zur Regulation der CBC-Assemblierung zeigten gleichzeitig, dass der CBC ein wichtiger Koordinator der oxidativen Stressantwort in Eukaryoten ist. Dies wird z. B. durch die Regulation der Gene *catB*, *glrA* und *prxA* deutlich. Die Deletion eines *hap*-Gens führt schließlich zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies oder Antioxidantien (Thön *et al*, 2010). Außerdem zeigen Hap-Deletionsmutanten ein verringertes Wachstum, eine Reduktion der Konidienanzahl und sind nicht mehr in der Lage, sich sexuell zu vermehren (Steidl *et al*, 1999). Diese Phänotypen sprechen für viele weitere bisher unbekannte Gene, die durch den CBC reguliert werden.

Tabelle 1: CBC-regulierte Gene in *A. nidulans*

Gen	Protein	Regulation	Referenz
<i>aataA</i>	Acyl-CoA: Isopenicillin N-Acyl-Transferase	Aktivierung	(Litzka <i>et al</i> , 1996; Litzka <i>et al</i> , 1999)
<i>aataB</i>	Acyl-CoA:6-Aminopenicillansäure-Acyltransferase	Aktivierung	(Spröte <i>et al</i> , 2008)
<i>acvA</i>	δ -(L- α -Aminoadipyl)-L-Cysteinyl-D-Valin-Synthetase	Repression	(Brakhage, 1998; Then Bergh <i>et al</i> , 1996)
<i>ipnA</i>	Isopenicillin N-Synthase	Aktivierung	(Then Bergh <i>et al</i> , 1996)

<i>amdS</i>	Acetamidase	Aktivierung	(Littlejohn & Hynes, 1992; Steidl <i>et al</i> , 1999)
<i>gdhA</i>	Glutamat-Dehydrogenase	Aktivierung	(Brakhage <i>et al</i> , 1999)
<i>fmdS</i>	Formamidase	Aktivierung	(Fraser <i>et al</i> , 2001)
<i>taa</i>	Taka-Amylase	Aktivierung	(Kato <i>et al</i> , 1997; Kato <i>et al</i> , 2001; Nagata <i>et al</i> , 1993)
<i>gatA</i>	γ -Aminobutyrate-Permease	Aktivierung	(Papagiannopoulos <i>et al</i> , 1996; van Heeswijk & Hynes, 1991)
<i>agdA</i>	α -Glukosidase	Aktivierung	(Brakhage <i>et al</i> , 1999; Tani <i>et al</i> , 2001)
<i>eglA</i>	Endo-Glukanase	Aktivierung	(Tanaka <i>et al</i> , 2001)
<i>lysF</i>	Homoaconitase	Repression	(Weidner <i>et al</i> , 2001)
<i>hapB</i>	HapB	Repression	(Steidl <i>et al</i> , 2001)
<i>napA</i>	Transkriptionsfaktor	Repression	(Thön <i>et al</i> , 2010)
<i>prxA</i>	Thioredoxin-abhängige Peroxidase	Repression	(Thön <i>et al</i> , 2010)
<i>catB</i>	Katalase	Aktivierung	(Thön <i>et al</i> , 2010)
<i>glrA</i>	Glutathion-Thioreduktase	Repression	(Thön <i>et al</i> , 2010)
<i>trxA</i>	Thioredoxin A	Repression	(Thön <i>et al</i> , 2010)
<i>trxR</i>	Thioredoxin-Reduktase	Repression	(Thön <i>et al</i> , 2010)
<i>cycA</i>	Cytochrom C	Repression (-Fe)	(Hortschansky <i>et al</i> , 2007)
<i>acoA</i>	Akonitase	Repression (-Fe)	(Hortschansky <i>et al</i> , 2007)
<i>hemA</i>	5-Aminolevulinate-Synthase	Repression (-Fe)	(Hortschansky <i>et al</i> , 2007)
<i>cccA</i>	Transporter	Aktivierung (++Fe)	(Gsaller <i>et al</i> , 2014)
<i>sidA</i>	Ornithin-Monooxygenase	Aktivierung (-Fe)	(Hortschansky <i>et al</i> , 2007)
<i>mirB</i>	Transporter	Aktivierung (-Fe)	(Gsaller <i>et al</i> , 2014)
<i>sreA</i>	GATA Transkriptionsfaktor	Repression (-Fe)	(Hortschansky <i>et al</i> , 2007)

2.4 Durch den CBC-vermittelte Regulationsmechanismen

Strukturanalysen haben ergeben, dass CBC-gebundene DNA eine Beugung von 73° aufweist (Huber *et al*, 2012). Diese Struktur zeigt eine hohe Ähnlichkeit mit der DNA-Beugung an Nukleosomen (Luger *et al*, 1997) (Beugungswinkel 68°) und unterstreicht damit die Verwandtschaftsbeziehung der CBC-Untereinheiten zu Histonen (Liberati *et al*, 1998a). Die Beugung der DNA ermöglicht dem CBC die Promotorarchitektur zu verändern, wodurch die Bindung anderer Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden kann. Die Krümmung könnte ebenfalls einen direkten Kontak des CBCs zur Transkriptionsmaschinerie erlauben, wie es für den NF-Y-Komplex mit TFIID beschrieben ist (Bellorini *et al*, 1997; Coustry *et al*, 1998).

Die transkriptionelle Aktivität des Hap-Komplexes in *S. cerevisiae* ist abhängig von der Anwesenheit der Histon-Acetyltransferase Gcn5p (Georgakopoulos & Thireos, 1992). Folglich wird vermutet, dass der CBC möglicherweise spezifische Enzyme rekrutiert, die für eine Auflockerung der Chromatinstruktur sorgen und die DNA-Zugänglichkeit erleichtern. Bekräftigt wird diese Theorie durch die Demonstration direkter Protein-Protein-Kontakte zwischen NF-Y und den Histon-Acetyltransferasen Gcn5p, P/CAF und p300 (Faniello *et al*, 1999; Li *et al*, 1998). Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass die CBC-Untereinheiten selbst acetyliert werden. Hinweise darauf liefert die Arbeit von Li *et al* (1998).

Weitere Studien zeigten, dass das H2B-ähnliche NF-YB durch eine Mono-Ubiquitinierung post-translational modifiziert wird (Nardini *et al*, 2013). Diese Ubiquitinierung des NF-YB am Lysinrest 138 ist equivalent zur Mono-Ubiquitinierung des H2B-Lysinrestes 120, welche einen wichtigen Schritt für die transkriptionelle Aktivierung darstellt (Robzyk *et al*, 2000; Weake & Workman, 2008). Die Mono-Ubiquitinierung von NF-YB geht der Ubiquitinierung von H2B voraus. Es folgt die Methylierung von H3 an den Lysinresten 4 und 79 in aktiv transkribierten Bereichen (Ruthenburg *et al*, 2007).

Im Menschen wurden Proteine entdeckt, die mit dem NF-Y-Komplex interagieren bzw. dessen Bindung an die CCAAT-Box der Promotor-Region von beispielsweise α -Collagen und IL-10 verstärken. Currie (1997) konnte eine direkte Protein-Protein-Interaktion nachweisen, andere Studien jedoch beschreiben eine Promotor-abhängige Interaktion, die von den flankierenden Sequenzen des Pentanukleotids CCAAT abhängig ist (Liberati *et al*, 1998a; Liberati *et al*, 1998b; Lin, 2006). Hierbei handelt es sich um das sogenannte *high mobility group chromosomal protein*, HMG-I(Y) (HMGA). Diese HMGA-Proteine besitzen drei AT-hook-Domänen und sind sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in der Lage, DNA zu binden, zu beugen, DNA aufzuwickeln oder einen Supercoil zu formen. Sie binden an AT-reichen Regionen in der kleinen Furche der DNA. Im Allgemeinen spielen Proteine mit AT-hook-Domäne eine wichtige Rolle in der Chromatinstruktur und arbeiten als Cofaktoren für Transkriptionsfaktoren (Aravind & Landsman, 1998; Reeves, 2000).

3 Chromatin und dessen Einfluss auf die Genregulation

3.1 Chromatin – Struktur und Funktion

Das genetische Material eukaryotischer Zellen ist in einer komplexen Struktur, bestehend aus DNA und Proteinen organisiert, um in den beschränkten Raum des Nukleus zu passen. Dieser Protein-DNA-Komplex ist bekannt als Chromatin und dient zum einen der Verpackung der

DNA aber auch dem Schutz der DNA vor Schäden und Stress. Darüber hinaus muss die gut verpackte DNA schnell zugänglich für verschiedene zelluläre Prozesse wie beispielsweise die DNA-Replikation und -Transkription sein. Aus diesem Grund wird die DNA, um Histonoktamere gewunden. Diese sind kleine, stark basische Proteine, die eine Bindung zu dem negativ geladenen DNA-Molekül favorisieren (Hamer, 1951). Dieser Prozess neutralisiert die negative Ladung und erlaubt der DNA bis zu 10.000-fach zu kondensieren. Die Grundbausteine des Chromatins sind Nukleosomen, die über eine sogenannte *linker*-DNA von etwa 70 bp miteinander verbunden sind und eine Nukleosomenkette bilden. Durch die Interaktion der Nukleosomen bildet sich eine Sekundärstruktur aus, die mit Hilfe eines Elektronenmikroskops als 30 nm Nukleosomenfaser sichtbar gemacht werden kann. Eine weitere Interaktion und Faltung der Nukleosomenfasern führt zur Tertiärstruktur des Chromatins. Die Stabilität dieser Strukturen beruht hauptsächlich auf *linker*-Histonen (H1). Ein Nukleosom besteht aus einem Histonoktamer, welches mit ~147 bp DNA etwa 1,7 mal umwickelt ist. Das Histonoktamer besteht aus je zwei Core-Histonen H2A, H2B, H3 und H4 (Rando & Chang, 2009). Diese Proteine sind in allen Eukaryoten hoch konserviert und besitzen eine zentrale globuläre Domäne und einen flexiblen N-terminalen Arm mit vielen positiv geladenen Aminosäuren. Das sogenannte *histone fold motif* (HFM) besteht aus drei α -Helices, die durch zwei Loops getrennt sind und koordiniert die Interaktion der Histone untereinander und mit DNA (Arents & Moudrianakis, 1995). Die N-terminale Domäne der Histone ist variabel und unstrukturiert und ragt aus dem Oktamer heraus. Ihre strukturelle Flexibilität ist wichtig für den dynamischen Chromatinkondensationsstatus. Histone ohne N-terminale Domäne wären nicht in der Lage, Strukturen höherer Ordnung auszubilden (Fletcher & Hansen, 1995; Schwarz *et al*, 1996). Bestimmte Aminosäuren der N-terminalen Domänen sind prädestiniert für post-translationale Modifikationen, die deren Ladung und somit die DNA-Bindungseigenschaften beeinflussen. Die Zugänglichkeit regulatorischer Elemente, wie Promotoren oder Replikationsstart-Sequenzen, wird durch 4 verschiedene Prozesse unterstützt, welche alle einen Einfluss auf die Chromatinstruktur haben. Erstens sind ATP-abhängige Chromatin-*Remodeling*-Komplexe in der Lage Nukleosomen zu verschieben oder zu eliminieren (Clapier & Cairns, 2009). Zweitens können die N-terminalen Domänen der Histone durch kovalente Modifikationen, wie Acetylierungen, Methylierungen, Ubiquitinierungen, Sumoylierungen und/oder Phosphorylierungen modifiziert werden (Lee *et al*, 2010). Drittens sind Histon-Chaperone an der Regulation des Auf- und Abbaus von Nukleosomen in den meisten DNA-Transaktionen beteiligt (Avvakumov *et al*, 2011). Und schließlich führt der Einbau von nicht-kanonischen Histonvarianten in ein Nukleosom zu speziellen Chromatindomänen (Talbert & Henikoff, 2010).

3.2 Histonvarianten

Histonvarianten unterscheiden sich von kanonischen Histonen in ihrer primären Aminosäuresequenz. Im Unterschied zu kanonischen Histonen, die für die DNA-Verpackung und die Genregulation zuständig sind, spielen Histonvarianten in einer Reihe von Prozessen eine Rolle, wie beispielsweise DNA-Reparaturen, meiotische Rekombination, Chromosomentrennung und Transkriptionsinitiation bzw. -termination (Talbert & Henikoff, 2010). Diese vielfältigen Funktionen lassen auf strukturelle Unterschiede zu den kanonischen Histonen und damit auf eine Änderung des Oktamers schließen. Strukturelle Veränderungen des Histonoktamers können wiederum einen Einfluss auf die DNA-Windung um die Histone haben und damit die dynamische Struktur des Chromatins verändern (Zlatanova *et al*, 2009).

Alle Nukleosomen innerhalb eines Organismus besitzen identische H4- und H2B-Moleküle wohingegen H3 und H2A eine Reihe von Varianten aufweisen. Es gibt zwei H3-Varianten, H3.3, welches aktives Chromatin markiert und CenH3, welches eine Strukturkomponente des centromeren Chromatins ist (Ahmad & Henikoff, 2002). Die meisten Varianten existieren von H2A, die wären H2A.X, H2A.Z, H2A.Z.2.2, H2A.Bbd und MacroH2A. Diese unterscheiden sich hauptsächlich in der Docking-Domäne am C-Terminus von H2A, die dafür zuständig ist, die N-terminale Helix von H3 in Kontakt mit der DNA zu bringen (Millar, 2013).

In *A. nidulans* existieren zwei sehr ähnliche Gene für H4 (H4.1 und H4.2), deren Transkripte sich nur in drei Aminosäuren unterscheiden und deren Funktion bisher ungeklärt ist (Goldman & Osmani, 2007). Neben dem CenH3 gibt es in Ascomyceten nur ein weiteres H3, welches dem H3.3 mehr ähnelt als dem kanonischen H3. Die translatierte Sequenz von H3 ist in allen sequenzierten *Aspergillus*-Genomen zu 100 % identisch. Des Weiteren enthalten alle *Aspergillus*-Genome nur ein konserviertes H2B-Homolog. Die Sequenz von H2A in Ascomyceten, einschließlich *Aspergillus*, zeigt eine größere Ähnlichkeit zur H2A.X-Variante anderer eukaryotischer Organismen als zum kanonischen H2A. Zusätzlich zum H2A.X existiert in *Aspergillus*-Genomen noch die H2A.Z-Variante. Der Effekt von H2A.X auf die Chromatinstruktur ist bisher nicht gut untersucht, die von H2A.Z jedoch schon. Im Gegensatz zu Hefe ist in Ascomyceten nur sehr wenig über die Funktion und die genomische Verteilung von H2A.Z-Histonen bekannt (Goldman & Osmani, 2007). In *S. cerevisiae* scheint der Einbau von H2A.Z ins Nukleosom mit reprimierten Promotoren assoziiert zu sein (Meneghini *et al*, 2003). Außerdem ist das Protein H2A.Z nicht essentiell und kann durch das kanonische Histon H2A ersetzt werden (Jackson & Gorovsky, 2000). In vielen anderen Organismen hingegen ist die Deletion des H2A.Z-Gens lethal, wie beispielsweise in *Xenopus laevis* (Iouvalen *et al*, 1996; Ridgway *et al*, 2004) und *Drosophila melanogaster* (Clarkson *et al*,

1999; van Daal *et al*, 1988). Die Struktur von H2A.Z-haltigen Nukleosomen führt zu der Schlussfolgerung, dass die Histonvariante zu einer Destabilisierung des Oktamers führt. H2A.Z-Oktamere können in zwei verschiedenen Varianten vorkommen, in der homotypischen Form mit zwei Kopien des H2A.Z-H2B-Dimers oder in der heterotypischen Form mit einem kanonischen H2A-H2B-Dimer. Aufgrund von Strukturanalysen wird vermutet, dass die heterotypische Form weitaus instabiler ist und das Nukleosom in einer aufgeweiteten Form vorkommt, was eine leichtere Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren oder andere DNA-bindende Proteine ermöglicht (Billon & Cote, 2013; Bönisch & Hake, 2012).

3.3 Histonmodifikationen

Histonmodifikationen spielen eine Schlüsselrolle für die Chromatinstruktur und haben somit einen enormen Einfluss auf die Genregulation. Neben Histon-Acetylierungen und -Ubiquitinierungen, die im Folgenden näher betrachtet werden, gibt es die Histon-Methylierung, -Phosphorylierung, -Ribosylierung, -Sumoylierung, -Citrullinierung, die Anheftung von β -N-Acetylglucosamin, die Histon-Prolin-Isomerisierung und das sogenannte Histon *Tail Clipping* (Bannister & Kouzarides, 2011). Die Methylierung findet hauptsächlich an den Lysin- und Arginin-Seitenketten der Histon N-Termini statt. Lysine können Mono-, Di- oder Tri-methyliert werden während Arginine Mono-, symmetrisch oder asymmetrisch Di-methyliert werden. Anders als die Acetylierung und die Phosphorylierung wirkt sich die Methylierung nicht auf die Ladung der Histone aus. Statt dessen werden Proteine bzw. Proteinkomplexe rekrutiert, die eine Änderung der Chromatinstruktur bewirken. Abhängig davon, welches Lysin/Arginin methyliert ist und in welcher Form, kann diese Modifizierung positiv oder negativ mit der Transkription korrelieren (Ng *et al*, 2009). Durch die Desaminierung von Argininen werden Histone citrulliniert. Dies beugt möglicherweise einer Methylierung vor (Bannister *et al*, 2002). Die Phosphorylierung erfolgt an Serin-, Threonin- und Tyrosin-Resten, jedoch nicht ausschließlich am N-terminalen Ende von Histonen. Durch die negative Ladung der Phosphat-Gruppe wird die Chromatinstruktur beeinflusst. Außerdem wird vermutet, dass eine Phosphorylierung sich auf den Acetylierungsstatus benachbarter Aminosäuren auswirkt (Lo *et al*, 2000; Shimada *et al*, 2008).

3.3.1 Acetylierung

Die Acetylierung ist eine weit verbreitete post-translationale Modifikation von Proteinen. Diese Modifikation ist mit fast allen zellulären Prozessen verknüpft. Bei einer Proteom-weiten

Suche nach acetylierten Lysinen wurden mehr als 1000 verschiedene Proteine in menschlichen Zelllinien und in *D. melanogaster* detektiert (Choudhary *et al.*, 2009; Weinert *et al.*, 2011). Die Acetylierung von Proteinen dient als Regulationsmechanismus für dessen Funktion. Ein bekanntes Beispiel ist der Acetylierungsstatus von Histonen, durch den die Genexpression entweder aktiviert oder reprimiert wird. Neben dessen Funktion für die Transkription sind Histon-Acetylierungen auch für die DNA-Replikation oder DNA-Reparaturmechanismen wichtig, in dem sie das Chromatin öffnen und es somit für Replikations- und Reparaturenzyme zugänglich machen (Falbo & Shen, 2009; Lucas *et al.*, 2007; Robert *et al.*, 2011; van Attikum & Gasser, 2009). Die reversible Modifikation wird durch Histon-Acetyltransferasen (HATs) katalysiert bzw. die Rückreaktion durch Histon-Deacetylasen (HDACs). HATs benötigen als Cofaktor Acetyl-CoA, um eine Acetyl-Gruppe auf die ϵ -Aminogruppe des Lysins zu transferieren. Diese Acetyl-Gruppe neutralisiert die positive Ladung des Lysins und schwächt somit die Interaktion zwischen DNA und Histonen. Es gibt zwei Gruppen von HATs, den Typ A und den Typ B. Typ B-HATs kommen vorrangig im Zytoplasma vor und acetylieren freie, neu synthetisierte Histone. Typ B-HATs bilden eine komplexere Gruppe von Enzymen. Abhängig von Struktur und Aminosäuresequenz werden sie der GNAT-, MYST- und CBP/p300-Familie zugeordnet. Typ A-HAT Enzyme sind häufig mit großen Proteinkomplexen assoziiert, deren Komponenten verschiedene Funktionen bezüglich der Rekrutierung, Aktivität und Substratspezifität dieser Enzyme ausüben. Ein interessantes Beispiel ist Gcn5, eine Untereinheit des Saga/Ada-Komplexes. Freies Gcn5 ist ausschließlich in der Lage, DNA-freie Histone zu acetylieren, befindet es sich hingegen im Saga-Komplex acetyliert Gcn5 auch Nukleosomen-gebundene Histone (Bannister & Kouzarides, 2011).

3.3.2 Ubiquitinierung

Ubiquitin ist ein kleines in Eukaryoten hoch konserviertes Protein bestehend aus 76 Aminosäuren. Es besitzt eine molekulare Masse von 8 kDa und wird über eine Isopeptid-Bindung zwischen dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins und der ϵ -Aminogruppe eines Lysins kovalent an das Zielprotein gebunden. Ubiquitinierungen spielen eine große Rolle in einer Reihe von zellulären Prozessen. Abhängig von der Art der Ubiquitinierung (Mono- oder Poly-Ub) und deren Position, wird das Zielprotein für verschiedene Prozesse markiert. Ein bekanntes Beispiel ist die Lysin 48 Poly-Ubiquitinierung, wodurch Zielproteine für den Abbau durch das 26S-Proteasom markiert werden. Der Mechanismus der Ubiquitinierung ist ein komplexer Prozess. Dieser wird durch drei Enzyme katalysiert, die E1

(Aktivierungsenzym), E2 (Konjugationsenzym) und E3 (Ligase) genannt werden (Zhang, 2003).

Bei der Ubiquitinierung von Histonen handelt es sich um eine Mono-Ubiquitinierung, die nicht mit dem Proteinabbau assoziiert ist, sondern eine Rolle in der Regulation der Chromatinstruktur und in der Genexpression spielt. Bisher konnten Ubiquitinierungen an den Histonen H1, H3, H2A und H2B nachgewiesen werden. Die Interessanteste ist die Mono-Ubiquitinierung am C-terminalen Ende von H2B. Diese Modifikation löst eine Methylierung an den Lysinresten 4 und 79 des Histons H3 aus (Wood *et al*, 2003), welche ein konserviertes Aktivierungssignal für die Transkription darstellt (Kim *et al*, 2009; Sun & Allis, 2002). Die Mono-Ubiquitinierung von H2BK123 in Hefe wird durch Rad6 (E2) und Bre1 (E3) katalysiert (Kim & Roeder, 2009). Eine korrekte Transkription kann jedoch nur stattfinden, wenn eine Deubiquitinierung durch Ubp8 folgt. Ubp8 ist eine Untereinheit des Saga/Ada-Komplexes (Henry *et al*, 2003; Lang *et al*, 2011). Interessanterweise fehlt diese Untereinheit dem Saga/Ada-Komplex von *A. nidulans* (Georgakopoulos *et al*, 2013).

4 Ziele dieser Arbeit

Der eukaryotische CCAAT-bindende Komplex (CBC) ist nicht nur ein Regulator zahlreicher Gene, sondern spielt möglicherweise auch eine große Rolle bei der Positionierung von Nukleosomen und damit der Organisation von Promotoren. Trotz zahlreicher Studien gibt es jede Menge Wissenslücken rund um diesen wichtigen, bei allen Eukaryoten vorkommenden Transkriptionsfaktorkomplex.

In Abhängigkeit von Eisen benötigt der CBC die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor HapX, um als Transkriptionsregulator für bestimmte Gene zu wirken (Hortschansky *et al*, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit sollten weitere Interaktionspartner des CBCs identifiziert werden. Koimmunopräzipitationsanalysen des Kernkomplexes CBC aus Zellkernextrakten stellen dazu mögliche Untersuchungsmethode dar. Weiterhin wurde gezeigt, dass der menschliche NF-Y-Komplex mit der Histon-Acetyltransferase Gcn5 interagiert, um Einfluss auf die Positionierung von Nukleosomen zu nehmen bzw. dass Untereinheiten des NF-Y-Komplexes selbst acetyliert werden. *In vivo* und *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien sollten Aufschluss darüber bringen, ob der CBC filamentöser Pilze ähnlich wie im Menschen mit der Saga/Ada-Untereinheit GcnE interagiert. Weiterhin war es von großem Interesse, ob der CBC durch weitere post-translationale Modifikationen reguliert wird, wie beispielsweise Acetylierungen oder Ubiquitinierungen.

Erstmals soll eine ausführliche Proteomkarte von *A. nidulans* erstellt werden, die als Grundlage für vergleichende Proteomanalysen zwischen einem *A. nidulans* Wildtyp-Stamm und einer HapC-Deletionsmutante dienen soll.

Damit dient diese Arbeit einem besseren Verständnis der Funktion des CBCs bzw. CBC-gesteuerter Prozesse.

MATERIAL & METHODEN

1 Stämme und Materialien

1.1 *Escherichia coli*- und *Aspergillus nidulans*-Stämme

Tabelle 2: Verwendete Bakterien- und Pilzstämme.

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Referenz
<i>E. coli</i>		
α -select	<i>rep</i> (pMB1), <i>eco47IR</i> , Amp ^R	Fermentas, St. Leon-Rot
BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> λ (DE3)	Agilent Technologies
Rosetta2 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> _B (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam ^R)	Merck Millipore
<i>A. nidulans</i>		
TN02A7 (Wildtyp)	<i>pyrG89; pyroA4; riboB2; argB2; ΔnkuA::argB; ArgB⁺</i>	(Nayak <i>et al</i> , 2006)
RMSO11 (Wildtyp)	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; veA1, trpC801</i>	(Stringer <i>et al</i> , 1991)
A1153 (Wildtyp)	<i>yA2, pabaA1; pyroA4; argB2; ΔnkuA::bar</i>	Fungal Genetic Stock Centre
RMSO11 Arg ⁺ (Wildtyp)	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; veA1, trpC801; argB; ArgB⁺</i>	diese Arbeit
A1153 Arg ⁺ (Wildtyp)	<i>yA2, pabaA1; pyroA4; argB2; ΔnkuA::bar; argB; ArgB⁺</i>	diese Arbeit
Nat24 (Δ <i>hapC</i>)	<i>pyrG89; pabaA1; riboB2; ΔhapC::riboB; RiboB⁺</i>	(Papagiannopoulos <i>et al</i> , 1996)
Δ <i>hapC</i> (RMSO11)	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; veA1, trpC801; ΔhapC::argB; ArgB⁺</i>	diese Arbeit
Δ <i>hapC</i> (A1153)	<i>yA2, pabaA1; pyroA4; argB2; ΔnkuA::bar; ΔhapC::argB; ArgB⁺</i>	diese Arbeit
Δ <i>ubcH</i> (AN8258) (RMSO11)	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; veA1, trpC801; ΔubcH::argB; ArgB⁺</i>	diese Arbeit
Δ <i>gcnE</i> (RMSO11)	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; veA1, trpC801; ΔgcnE::argB; ArgB⁺</i>	diese Arbeit
Δ <i>hapY</i> (A1153)	<i>yA2, pabaA1; pyroA4; argB2; ΔnkuA::bar; ΔhapY::argB; ArgB⁺</i>	diese Arbeit
<i>hapC</i> ^{Venus}	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; veA1, trpC801; ΔhapC::argB; hapCvenus::ptrA; ArgB⁺, PT^R</i>	diese Arbeit
<i>hapCK129R</i> ^{Venus}	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; veA1, trpC801; ΔhapC::argB; hapCK129Rvenus::ptrA; ArgB⁺, PT^R</i>	diese Arbeit
<i>gcnE</i> ^{Venus}	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; veA1, trpC801; ΔgcnE::argB; gcnEvenus::ptrA; ArgB⁺, PT^R</i>	diese Arbeit

<i>Venus</i> <i>gcnE</i>	<i>pabaA1</i> , <i>yA2</i> ; Δ <i>argB::trpCAB</i> ; <i>veA1</i> , <i>trpC801</i> ; Δ <i>gcnE::argB</i> ; <i>venusgcnE::ptrA</i> ; ArgB^+ , PT^{R}	diese Arbeit
<i>hapY</i> ^{<i>Venus</i>}	<i>yA2</i> , <i>pabaA1</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::bar</i> ; Δ <i>hapY::argB</i> ; <i>hapYvenus::pyroA</i> ; ArgB^+ ; PyroA^+	diese Arbeit
<i>hapC</i> ^{<i>VenusC</i>}	<i>yA2</i> , <i>pabaA1</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::bar</i> ; Δ <i>hapC::argB</i> ; <i>hapCvenusC::ptrA</i> ; ArgB^+ , PT^{R}	diese Arbeit
<i>hapC</i> ^{<i>VenusC</i>} / <i>hapY</i> ^{<i>VenusN</i>}	<i>yA2</i> , <i>pabaA1</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::bar</i> ; Δ <i>hapC::argB</i> ; <i>hapCvenusC::ptrA</i> ; <i>hapYvenusN::pyroA</i> ArgB^+ , PT^{R} ; PyroA^+	diese Arbeit
<i>hapC</i> ^{<i>VenusC</i>} / <i>venusN</i> <i>gcnE</i>	<i>yA2</i> , <i>pabaA1</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::bar</i> ; Δ <i>hapC::argB</i> ; <i>hapCvenusC::ptrA</i> ; <i>venusNgcN::pyroA</i> ArgB^+ , PT^{R} ; PyroA^+	diese Arbeit

1.2 Medien und Zusätze

Tabelle 3: Anzuchtmedien für *E. coli* und *A. nidulans*

Stammlösungen/Medien	Bestandteile	Konzentrationen
<i>E. coli</i>		
LB-Medium (Miller, 1972)	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	(Agar)	(15 g/l)
TB Autoinduktionsmedium	TB	60 g/l
	Glycerin	12,6 g/l
<i>A. nidulans</i>		
ASP-N	KCl	350 mM
	KH ₂ PO ₄	550 mM
	pH 6,5	
ASP+N	KCl	350 mM
	KH ₂ PO ₄	550 mM
	NaNO ₃	3.5 mM
	pH 6,5	
COVE (1000x)	ZnSO ₄ •7H ₂ O	30,6 mM
	CuSO ₄ •5H ₂ O	1,6 mM
	MnSO ₄ •H ₂ O	650 µM
	Na ₂ B ₄ O ₇ (85%)	262 µM
	ZnSO ₄ •7H ₂ O	40 µM
<i>Aspergillus</i> Minimal Medium (AMM)	ASP+N (ASP-N)	20 ml
	(Glutamin (300 mM))	(66 ml)

(Pontecorvo <i>et al</i> , 1953)	Glucose (50 %, w/v)	20 ml
	MgSO ₄ (1 M)	2 ml
	COVE (1000x)	1 ml
	FeSO ₄ (15 mM)	2 ml
	(Agar)	(15 g/l)
	H ₂ O	auf 1 l
	ASP+N	20 ml
	Glucose (50 %, w/v)	20 ml
	MgSO ₄ (1 M)	2 ml
	COVE (1000x)	1 ml
<i>Aspergillus</i> Voll Medium (AVM)	FeSO ₄ (15 mM)	2 ml
	Hefeextrakt (10 %, w/v)	50 ml
	Casamino Acids (10 %, w/v)	10 ml
	H ₂ O	auf 1 l

Falls notwendig, wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Zusätze zu den in Tabelle 3 beschriebenen Medien gegeben.

Tabelle 4: Zusätze zu Anzuchtmedien von *E. coli* und *A. nidulans*

Funktion der Zusätze	Art der Zusätze	Konzentrationen
Zusätze zu <i>E. coli</i>-Medien		
Antibiotika	Ampicillin	100 µg/ml
	Kanamycin	5 µg/ml
Zusätze zu <i>A. nidulans</i>-Medien		
Auxotrophiemarker	Uridin (1 M)	10 ml/l
	Riboflavin (64 mg/l)	10 ml/l
	Pyridoxin (500 mg/l)	2 ml/l
	4-Aminobenzoessäure (0,1 %, w/v)	3 ml/l
	Arginin (0,5 M)	20 ml/l

1.3 Plasmide

Tabelle 5: Verwendete Plasmide

Plasmid	Relevanter Genotyp/Phänotyp	Referenz
<i>E. coli</i> Expressionsplasmide		
pET28aS2TTH	Kan ^R	Peter Hortschansky
pMalC2HTEV	Amp ^R	Peter Hortschansky
pET28aH6TEV	Kan ^R	Peter Hortschansky
13AB22JP_AN8826_pMA-T	Amp ^R , synthetisches Gen <i>hapY</i>	GeneArt AG
pET28aH6TEVAN8826	Kan ^R , synthetisches Gen <i>hapY</i>	diese Arbeit
pMalC2HTAN8826	Amp ^R , synthetisches Gen <i>hapY</i>	diese Arbeit
pMalC2HTGcnE	Amp ^R , <i>gcnE</i> aus <i>A. nidulans</i>	diese Arbeit
pET28aH6TGcnE	Kan ^R , <i>gcnE</i> aus <i>A. nidulans</i>	diese Arbeit
pET28aGcnETH6	Kan ^R , <i>gcnE</i> aus <i>A. nidulans</i>	diese Arbeit
pET28aS2GcnETH6	Kan ^R , <i>gcnE</i> aus <i>A. nidulans</i>	diese Arbeit

pET28aMalTGcnETH6	Kan ^R , <i>gcnE</i> aus <i>A. nidulans</i>	diese Arbeit
<i>Aspergillus</i> Plasmide		
pJet 1.2/blunt	<i>rep</i> (pMB1), <i>eco47IR</i> , Amp ^R	Fermentas, St. Leon-Rot
pSK275 (syn. pME3024)	Amp ^R , PT ^R	(Krappmann <i>et al</i> , 2006)
pLUC-TargB03seq	Amp ^R , GLuc, <i>argB</i>	Volker Schroeckh, nicht veröffentlicht
pabaAnid	Amp ^R , <i>pabaA</i>	(Tüncher <i>et al</i> , 2005)
pBS_Afpyro	Amp ^R , <i>pyroA</i>	(Kriangkripipat & Momany, 2009)
1049975 Venus pMA	Amp ^R , <i>venus</i>	Geneart AG
plinker ^{Venus} -ptrA	Amp ^R , PT ^R , <i>venus</i>	diese Arbeit
p ^{Venus} linker-ptrA	Amp ^R , PT ^R , <i>venus</i>	diese Arbeit
phapC ^{Venus} -ptrA	Amp ^R , PT ^R , <i>hapC-venus</i>	diese Arbeit
phapC(K129R) ^{Venus} -ptrA	Amp ^R , PT ^R , <i>hapCK129R-venus</i>	diese Arbeit
phapC ^{VenusC} -ptrA	Amp ^R , PT ^R , <i>hapC-venusC</i>	diese Arbeit
phapC ^{VenusN} -ptrA	Amp ^R , PT ^R , <i>hapC-venusN</i>	diese Arbeit
pgcnE ^{Venus} -ptrA	Amp ^R , PT ^R , <i>gcnE-venus</i>	diese Arbeit
p ^{Venus} gcnE-ptrA	Amp ^R , PT ^R , <i>venus-gcnE</i>	diese Arbeit
p ^{VenusC} gcnE-pyroA	Amp ^R , <i>pyroA</i> , <i>venusC-gcnE</i>	diese Arbeit
p ^{VenusN} gcnE-pyroA	Amp ^R , <i>pyroA</i> , <i>venusN-gcnE</i>	diese Arbeit
phapY ^{Venus} -pyroA	Amp ^R , <i>pyroA</i> , <i>hapY-venus</i>	diese Arbeit
phapY ^{VenusC} -pyroA	Amp ^R , <i>pyroA</i> , <i>hapY-venusC</i>	diese Arbeit
phapY ^{VenusN} -pyroA	Amp ^R , <i>pyroA</i> , <i>hapY-venusN</i>	diese Arbeit

1.4 Oligonukleotide

Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
<i>hapC</i> up for	AGT GAC AGC ATT GGC TTG ACT
<i>hapC</i> up rev	CGG TTG CTA GCA GAT CTG TTA TTT TAG CTG TTG GCG AAG GT
<i>hapC</i> down for	CGA TCA CGA AAA GCC TGT TAA AAT GTA CAG GGG ACC TGT TG
<i>hapC</i> down rev	TTC ATA TTC CCT CCG CGA
Huga-luc_ <i>argB</i> for	TAA CAG ATC TGC TAG CAA CCG
Huga-luc_ <i>argB</i> rev	TAA CAG GCT TTT CGT GAT CG
<i>nosTXmaI</i> for	GAT CCC CGG GAT CGT TCA AAC ATT TGG CAA TAA AGT TTC TTA AG
<i>nosTPstI</i> rev	ACT GCT GCA GTT CTC ATG TTT GAC AGC TTA TCA TCG GAT C
<i>SpeI</i> -Linker-Venus for	AGC TCA CTA GTG GAG GCG GCG GAT CTG GCG GAG GAG GCT CAG GCG GAG GCG GCT CTA TGG TCA GCA AGG GCG AGG AAC
<i>XmaI</i> -Venus rev	TGC AGC CCG GGT TAC TTG TAC AGC TCG
VenusNotI for	AAC AGC GGC CGC ATG GTC AGC AAG GGC GAG GAA CTC
VenusLinkerSpeI rev	ACG TAC TAG TCC GCC TCC GCC TGA GCC TCC TCC GCC AGA TCC GCC GCC TCC TCT CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC GAG
AN4034 up+ <i>hapCNotI</i> for	AAC AGC GGC CGC AAG CCG TGG CTT GGT GGA GAT TTC
AN4034 up+ <i>hapCSpeI</i> rev	ACT GAC TAG TAT AAG ATT CGC CAC CAG CTC CGT TAT

	G
AN4034 down <i>KpnI</i> for	GTC <u>AGG TAC CTG</u> TTA CGG AAA TGT ACA GGG GAC C
AN4034 down <i>KpnI</i> rev	GTC <u>AGG TAC CAT</u> ACT TTA CCT GGG TAC ATG CGG G
AN8258 up for	CAA GTC CCC CCA AGA ACT GGA C
AN8258 up rev	CGG TTG CTA GCA GAT CTG TTA GTG GCG GTA CTA GGT
	GTA TAG ATA G
AN8258 down for	CGATCACGAAAAGCCTGTTA GTT TCC GCA GCG GCA TGT
	TCA TAC
AN8258 down rev	GTA CGC CAG GCA TAC ACC TAA GC
AN8826 up for	CAT CTA GAA TTT TTC CGG GTT C
AN8826 up rev	CGG TTG CTA GCA GAT CTG TTA TCA TAG AAG CCG AAT
	GTA CCC A
AN8826 down for	CGA TCA CGA AAA GCC TGT TAT GAA AAC ACT GCA CCC
	ATG T
AN8826 down rev	TAG GGC AAC CAA AGA GGA TT
AN8826 up <i>NotI</i> for	AAC AGC GGC <u>CGC</u> CAT CTA GAA TTT TTC CGG GTT C
AN8826 <i>SpeI</i> rev	ACG <u>TAC TAG TTGT</u> TCG TTT CTC GGC CGT TG
AN8826 down <i>KpnI</i> for	GTC <u>AGG TAC CTG</u> AAA ACA CTG CAC CCA TGT
AN8826 down <i>KpnI</i> rev	ACT <u>GGG TAC CTA</u> GGG CAA CCA AAG AGG ATT
<i>pyroA</i> <i>NheI</i> for	AGA <u>CGC TAG CCA</u> GGA ATT CGA TGG ACA TCA
<i>pyroA</i> <i>BlpI</i> rev	AGA <u>CGC TAA GCA</u> ATC AGC TTT TCA GAA TTC GC
<i>SpeI</i> linkerVenusC for	AGC <u>TCA CTA GTG</u> GAG GCG GCG GAT CTG GCG GAG GAG
	GCT CAG GCG GAG GCG GCT CTG ACA AGC AGA AGA ACG
	GCA TC
<i>XmaI</i> VenusN rev	TGC AGC CCG <u>GGT</u> TAC TCG ATG TTG TGG CGA ATC TTG
<i>gcnE</i> up for	TTG TCG GAC GCA CTG ATT T
<i>gcnE</i> up rev	CGG TTG CTA GCA GAT CTG TTA TTG CTA TGC GAG TAA
	GCT GAA
<i>gcnE</i> down for	CGA TCA CGA AAA GCC TGT TAC GGC AGT GGT GGT TAA
	CCT
<i>gcnE</i> down rev	CGA CCG TAC AGA AAA AAT TGC
AN3621down <i>NdeI</i> for	ACT <u>GCA TAT GTA</u> GAG TGG TTA ATA ATT CGA TAT GAG
	GCG
AN3621down <i>KpnI</i> rev	TAC <u>CGG TAC CCG</u> TGT ATA TCG ACC GTA CAG AAA AAA
	TTG C
AN3621up+ <i>gcnESpeI</i> rev	ACG <u>TAC TAG TGT</u> GTC CAT CGG CCA GAT GCT AAA TTG
AN3621up+ <i>gcnENotI</i> for	AAC <u>AGC GGC CGC</u> GGT TGC GGG TGA AAA AAG GAT AGG
	AG
AN3621up <i>NotI</i> rev	ACT <u>GGC GGC CGC</u> TGT AAG CTT GTT GCT ATG CGA GTA
	AGC TG
AN3621 <i>SpeI</i> for	ACG <u>TAC TAG TG</u> ATG ACT GAA AGT GGG TTG CAG GCC
AN3621 <i>XmaI</i> rev	GAT <u>CCC CGG GTC</u> AGT GTC CAT CGG CCA GAT GCT AAA
	TTG
ANGenEBamHlf	AAC TGG GAT <u>CCA</u> TGA CTG AAA GCC CAG GCG TAA AGC
ANGenEHindIIIr	ACT <u>GAA GCT TTT</u> AGT GTC CAT CGG CCA GAT GCG AC
ANGenENdelf	AAC <u>TGC ATA TGA</u> CTG AAA GCC CAG GCG TAA AGC
ANGenEBamHlr	AAC <u>TGG GAT CCG</u> TGT CCA TCG GCC AGA TGC GAC
ANGenENcolf	AAC <u>TGC CAT GGG</u> CAT GAC TGA AAG CCC AGG CGT AAA
	GC
AN4034 K129R for	AAT CTA TTT GTC GCG CTA TCG AGA GG
AN4034 K129R rev	CCT CTC GAT AGC GCG ACA AAT AGA TT

1.5 Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper		
Anti-GFP antibody (ab290)	1:2500	Abcam (Cambridge, UK)
Ub (P4D1)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-acetyl-Histone H3 Antibody	1:5000	Merck Millipore
Sekundärantikörper		
Anti-Mouse IgG-AP	1:30000	Sigma-Aldrich
Anti-Rabbit IgG-AP	1:5000	Sigma-Aldrich

2 Kultivierung von Mikroorganismen

2.1 Stammkulturen

Die Lagerung der *A. nidulans*-Stämme erfolgte in Kryokulturen bei -80 °C und als Sporensuspensionsstock bei 4 °C. Für alle Experimente wurde eine frische Sporensuspension hergestellt. Mittels einer Impföse und dem Sporensuspensionsstock wurde eine AMM Agar-Platte mit den Stamm-spezifischen Zusätzen angeimpft und für 2-3 Tage bei 37 °C inkubiert. Die Sporen wurden mit 5-10 ml steriler Kochsalzlösung (0,9 % (w/v) NaCl) und einem Spatel geerntet und durch Cell Strainer (BD Biosciences, Heidelberg) mit 40 µm Porengröße filtriert. Die Anzahl der Sporen wurde mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer oder dem CASY Cell Counter + Analyser System Modell TT (Roche Innovatis, Reutlingen) bestimmt.

2.2 Flüssigkultivierung

Die Flüssigkultivierung erfolgte in Schüttelkolben. Diese wurden bis zu einem Fünftel mit Medium befüllt, um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff zu garantieren. Alle *A. nidulans*-Stämme und *E. coli*-Kulturen wurden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert, wenn nicht anders ausgewiesen. *Aspergillus* Minimal Medium wurde unter sterilen Bedingungen mit 10⁶ Sporen/ml angeimpft. LB-Medium wurde mit einer Einzelkolonie von *E. coli* angeimpft.

2.3 Tropfplattensensitivitätstest

Um die Wachstumsfähigkeit verschiedener *A. nidulans*-Stämme auf unterschiedlichen Nährstoffen bzw. die Sensitivität gegen stressinduzierende Substanzen zu testen, wurden Sporensuspensionen der Verdünnungsstufen 10⁵-10² in je 10 µl Volumen auf Agarplatten

aufgetropft und für 2-3 Tage bei 37 °C inkubiert. Die Ergebnisse wurden anschließend durch Fotografieren dokumentiert.

2.4 Bestimmung der Feuchtbiomasse aus Flüssigkulturen

Das Myzel wurde mittels Miracloth-Filtergaze geerntet, zwischen Papiertüchern getrocknet und gewogen. *E. coli*-Kulturen wurden bei 7500 x g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde abgossen und das Zellpellet gewogen.

2.5 Bestimmung des Glukoseverbrauchs in Flüssigkulturen

Der Glukoseverbrauch in Flüssigkulturen wurde mittels des „BIOSEN C_line, GP+“ von EKF Diagnostic (Barleben) bestimmt. Dazu wurden je 20 µl einer 1:2 verdünnten Probe in ein Reaktionsgefäß mit 1 ml „Glukose/Laktat-Hämolyselösung“ (EKF Diagnostic, Barleben) gegeben und im Gerät vermessen.

3 Molekularbiologische Methoden

3.1 Klonierung und *in vitro* enzymatische Modifizierung von DNA

Standard Klonierungsprozesse wie z. B. Restriktionsverdau, das Einbauen oder Entfernen von 5'-Phosphat-Gruppen und die Ligation kompatibler DNA-Enden wurden gemäß den Protokollen der Hersteller durchgeführt (New England Biolabs, Bionline, Roche Diagnostics; Deutschland). Im Anschluss erfolgte die Transformation von *E. coli* mit DNA entsprechend der CaCl₂-Methode zur Vervielfältigung der generierten Plasmide.

3.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Positiv transformierte *E. coli*-Kolonien wurden verwendet um eine LB Kultur für eine Mini-(2 ml) bzw. eine Midi-(50 ml) Plasmid-Präparation anzupflanzen. Die Plasmid-Isolation wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits oder dem QIAGEN Plasmid Midiprep Kit gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

3.3 Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Auftrennung, Größenbestimmung und Konzentrationsabschätzung von DNA-Fragmenten erfolgte in horizontalen Agarosegelen. Die Agarosekonzentration betrug 1 % (w/v) in TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl pH 8,5, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) und zusätzlich waren

0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthalten. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 90-130 V in TAE-Puffer. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen DNA-Ladepuffer (100 mM EDTA, 0,05 % (w/v) Xylencyanol, 30 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau in TAE-Puffer) versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Als Größenstandard diente der Hyperladder I (Bioline, Luckenwalde).

3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente für Klonierungen oder zur Verwendung als Hybridisierungs sonden erfolgte mittels PCR. Für diesen Zweck wurde der GoTaq Green Mastermix (Promega, Mannheim) verwendet oder alternativ der Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Fisher Scientific, Schwerte) mit Korrekturlesefunktion. Die Reaktionszyklen wurden in einer PCR-Maschine durchgeführt. Die Elongationszeit und die spezifische Temperatur zur Anlagerung der Primer an die DNA wurden auf Grund der Länge des zu vervielfältigenden DNA-Fragments und der Länge und Sequenz der Primer bestimmt. Pro Reaktion wurden ca. 10 ng Template-DNA und 10 pmol Primer eingesetzt.

3.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration von Plasmid-DNA und RNA wurde das NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) verwendet. Es wurden jeweils 2 µl Probe vermessen.

3.6 Isolierung chromosomaler DNA aus *A. nidulans* und Southern-Hybridisierung

Für die Isolation chromosomaler DNA aus *A. nidulans* wurde Myzel aus einer ÜN-Kultur mittels Miracloth-Filtergaze geerntet, getrocknet und in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill fein zerkleinert. Etwa 100 mg gemörsertes Myzel wurden für die Extraktion verwendet, die mit Hilfe des „Epicentre DNA Purification Kits MasterpureTM“ gemäß dem Protokoll des Herstellers erfolgte. Die DNA wurde nach dem Trocknungsschritt in 100 µl MilliQ mit 0,1 µg/µl RNase aufgenommen, für 1 h bei 60 °C im Thermoblock inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

Für die Southern Blot-Analyse wurde die DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym ÜN verdaut, über ein Agarosegel aufgetrennt (Southern, 1975) und anschließend mittels Kapillarkräften auf eine Hybond N+-Nylonmembran (GE Healthcare, Deutschland) transferiert (Sambrook & Russell, 2001). Die übertragene DNA wurde durch Bestrahlen mit UV-Licht an der Membran fixiert und für eine Stunde bei 65 °C in Hybridisierungslösung

(DIG Easy Hyb) prähybridisiert. Anschließend wurden 10 µl DNA-Sonde mit DIG-11-markierten dUTPs (Jena Bioscience, Jena) hergestellt, 5 min bei 95 °C im Thermoblock denaturiert und der Hybridisierungslösung zugefügt. Die Hybridisierung erfolgte ÜN bei 65 °C. Im Anschluss wurde die Membran 2x 15 min bei 65 °C mit 1x SSC, 0,1 % (w/v) SDS und 2x 15 min mit 0,1x SSC, 0,1 % (w/v) SDS gewaschen. Im weiteren Verlauf wurde nach dem Protokoll von Roche Diagnostics GmbH zur Detektion mit CDP-Star, *ready to use* verfahren.

3.7 Isolierung von Gesamt-RNA aus *A. nidulans* und Northern Blot-Analyse

Zur Extraktion von RNA aus *A. nidulans* wurde Myzel aus Flüssigkulturen über Miracloth-Filtergaze geerntet, mit kaltem Wasser gewaschen, getrocknet und in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zermahlen. Etwa 100 mg gemörsertes Myzel wurden mit 800 µl TRIsure (Bioline, Luckenwalde) versetzt und mit dem Vortex geschüttelt. Die folgenden Schritte erfolgten gemäß dem Protokoll des Herstellers. Das RNA-Pellet wurde je nach Größe in 50-100 µl DEPC-Wasser (Bioline, Luckenwalde) aufgenommen.

Für die Northern Blot-Analyse wurden 10 µg RNA 1:1 mit Probenpuffer (50 % (v/v) Formamid, 5 % (v/v) Formaldehyd, 1x Reaktionspuffer, 8 % (v/v) Glycerin, 20 µg/ml Ethidiumbromid, Bromphenolblau) vermischt und 15 min bei 60 °C denaturiert. Die RNA wurde mittels Elektrophorese in einem RNA-Gel (1,2 % (w/v) Agarose, 2 % (v/v) Formaldehyd in 1x Reaktionspuffer) mit 1x Reaktionspuffer (40 mM MOPS-Puffer, 10 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, pH 7,0) als Laufpuffer für 2-3 h bei 90 V aufgetrennt und im Anschluss mit Hilfe von Kapillarkräften auf eine Hybond N⁺-Nylonmembran übertragen (Sambrook & Russell, 2001). Nach dem Fixieren der RNA auf der Membran durch UV-Licht erfolgte die Hybridisierung ÜN bei 65 °C. Als Sonde diente ein DIG-markiertes DNA-Fragment. Das Waschen der Membran und die Detektion spezifischer mRNA erfolgte in gleicher Weise wie bei der Southern-Hybridisierung.

3.8 Transformation von *A. nidulans*

Die Transformation von *A. nidulans* mit DNA-Fragmenten erfolgte nach der Methode von Ballance and Turner (1985).

4 Biochemische Methoden

4.1 Zellkernisolierung aus *A. nidulans* mit anschließender Protein Extraktion und Koimmunopräzipitation

Die Zellkernisolierung wurde basierend auf der Methode von van Heeswijck and Hynes (1991) durchgeführt. Für die Isolation von Zellkernen wurden 100 ml AMM-Glutamin mit 2×10^6 Sporen/ml angeimpft und 24 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Das Myzel wurde über Miracloth geerntet, mit kaltem Wasser gewaschen und zwischen Papiertüchern getrocknet. Ungefähr 10 g Feuchtbioasse wurden bei 4 °C mit flüssigem Stickstoff, Mörser und Pistill fein gemahlen und in 20 ml NIB-A Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM Mg-Acetat, 20 % (v/v) Glycerin, 5 mM EGTA, 3 mM CaCl_2 , 1 M Sorbitol, 7 % (w/v) FICOLL, 5 mM DTT, 1xComplete Protease Inhibitor (Roche)) resuspendiert. Nach kurzem Einfrieren in flüssigem Stickstoff und wieder Auftauen wurden dem Gemisch unter ständigem Rühren langsam 40 ml NIB-B Puffer (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM Mg-Acetat, 10 % (v/v) Glycerin, 5 mM EGTA, 5 mM DTT, 1xComplete Protease Inhibitor) zugeführt. Das Gemisch wurde für 7 min bei 4 °C und 1500 x g in einem Ausschwingrotor zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig auf 5 ml NIB-C Puffer (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM Mg-Acetat, 10 % (v/v) Glycerin, 1 M Sucrose, 5 mM DTT) gegeben und es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 16.500 x g, 4 °C für 30 min. Das erhaltene Zellkernpellet wurde in 1,5 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 0.1 % (v/v) Triton X-100, 1x Complete Protease Inhibitor, 1 mM DTT, 100 U Benzonase (25 U/ μl)) aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert, um die Zellkernproteine zu extrahieren. Unerwünschte Zellreste wurden durch Zentrifugation bei 100.000 x g und 4 °C für 30 min entfernt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem Proteinextrakt eine Koimmunopräzipitation durchgeführt. Hierfür wurden je Probe 25 μl GFP-Trap Agarose (ChromoTek GmbH, Planegg-Martinsried, Deutschland) in Extraktionspuffer äquilibriert und anschließend mit dem Proteingemisch für 4 h bei 4 °C rotierend, inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit Waschpuffer (40 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl) und drei Waschschritte mit Wasser. Die Proteine wurden mit 100 μl Elutionspuffer (5 % (v/v) Essigsäure, 10 % (v/v) Acetonitril) eluiert. Abschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt und ein tryptischer Verdau durchgeführt.

4.2 Heterologe Produktion und Isolation von Proteinen aus *E. coli*

Für die heterologe Produktion von Proteinen in *E. coli* wurde 1 l Overnight Express™ Instant TB-Medium (Novagen), verteilt auf fünf 2 l Schikanekolben mit einer 3 ml ÜN LB-Vorkultur

angeimpft und für etwa 24 h bei 100 rpm und einer definierten Temperatur (siehe Ergebnisse 1.7 und 2.4) geschüttelt. Ungefähr 20 g Feuchtbioasse wurden durch Zentrifugation bei 7500 x g, 4 °C für 20 min geerntet. Nach kurzem Einfrieren bei -80 °C wurde das Zellpellet in 200 ml Lysepuffer (Puffer A (siehe 5.3) + 1 mM DTT, 1 mM AEBSF) resuspendiert. Mittels dem „Emulsiflex C5 high pressure“ Homogenisator (Avestin) wurden die Zellen aufgeschlossen. Anschließend wurden Zellreste bei 30.000 x g, 4 °C für 30 min abzentrifugiert und der Überstand mit den enthaltenden löslichen Proteinen wurde filtriert (1,2 µm Porengröße).

4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1976). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration für die 2D-Gelelektrophorese wurde ein Farbstoffkonzentrat (BioRad Protein Assay Dye Reagent concentrate, BioRad, München) im Verhältnis 5:1 mit der Probe vermischt und 5 min im Dunkeln inkubiert. Die Absorption wurde bei 595 nm in einem UV-VIS-Spektrometer (UVmini 1240, Shimadzu, Duisburg, Deutschland) gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe einer BSA-Eichreihe (BSA Standard, BioRad, München) und dem Verdünnungsfaktor der Proteinextrakte berechnet.

Die Proteinkonzentrationen der anderen Proteinextrakte wurde mit Hilfe des Coomassie PlusTM Protein Assay Reagent (Thermo Scientific, Rockford, Vereinigte Staaten) bestimmt, welches 1:1 mit der Proteinprobe vermischt. Anschließend wurde die Absorption der Probe mit dem Jasco V-630 Spektrophotometer bei 595 nm gemessen wurde. Die Proteinkonzentration wurde mittels einer BSA-Eichkurve und dem Verdünnungsfaktor bestimmt.

4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mit fertigen SDS-Polyacrylamid-Gelen (NuPAGE 4 – 12 % Bis-Tris Gel; Invitrogen, Karlsruhe). Die Proteinproben wurden auf die gewünschte Konzentration eingestellt, mit „NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)“ versetzt und 10 min bei 70 °C denaturiert. Alle Proben wurden mit 50 mM Dithiothreitol (DTT) behandelt, um Disulfidbrücken zu reduzieren und die Bildung von Multimeren zu verhindern. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 200 V für ca. 30 min. Als Größenstandard diente der „Bench Mark Protein Ladder“ (Invitrogen, Karlsruhe). Zur Visualisierung der Proteine wurde das Gel für 20 min in Coomassie-Färbelösung (0,2 % (w/v) Coomassie R-250, 45 % (v/v)

MeOH, 10 % (v/v) Essigsäure) geschwenkt und anschließend ÜN mit Entfärbelösung (20 % (v/v) MeOH, 10 % (v/v) Essigsäure) behandelt.

4.5 Western Blot

Der Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf eine PVDF-Membran wurde mittels des iBlot® Dry Blotting Systems (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Der Aufbau erfolgte nach Herstellerangaben. Transferiert wurde mit Programm 3 des iBlot Gel Transfer Geräts. Anschließend wurde die PVDF-Membran 1 h bei RT in Blockierungslösung (3 % (w/v) BSA in 1x PBS) inkubiert. Es folgte eine einstündige Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper in Blockierungslösung. Danach wurde die Membran 2x 5 min mit 1x PBS, 2x 5 min mit 1x PBS + 0,1 % (v/v) Tween und 2x 5 min mit 1x PBS gewaschen. Nach einstündiger Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper (gelöst in Blockierungslösung), erfolgten die selben Waschschrte wie nach der Inkubation mit dem Primärantikörper. Detektiert wurde mit dem 1-Step™ NBT/BCIP Substrat (Thermo Scientific).

4.6 2D-Gelelektrophorese

Die Auftrennung komplexer Proteingemische erfolgte mit der 2D-Gelelektrophorese basierend auf der von Kniemeyer *et al* (2006) etablierten Methode.

4.6.1 Denaturierende Proteinisolation aus *A. nidulans*-Myzel

Die Proteinextraktion für 2D-Gelelektrophoresen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels TCA/Aceton Fällung. Hierfür wurde Myzel aus Flüssigkulturen zu einem definierten Zeitpunkt geerntet, mit kaltem Wasser gewaschen, getrocknet und mit Hilfe von flüssigem Stickstoff gemörsert. Für die TCA/Aceton Fällung wurden 100 mg gemörsertes Myzel in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und mit eiskalter TCA-Lösung (13,3 % (w/v) TCA, 0,3 % (w/v) DTT in Aceton) versetzt, mit dem Vortex gemischt und bei -20 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 30 s mit dem Vortex gemischt und bei 4 °C und 16.100 x g für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde zwei Mal mit 1 ml eiskalter Waschlösung (0,3 % (w/v) DTT in Aceton) gewaschen und danach 15 min bei RT getrocknet. Die Proteine wurden in 300 µL Lysepuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % (w/v) CHAPS, 30 mM Tris, 1 % (w/v) Zwittergent) resuspendiert, 10 min in einem Ultraschallbad inkubiert und 1 h bei -80 °C eingefroren. Die Proben wurden auf RT erwärmt und 20 min bei 16 °C und 16.100 x g

zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde bis zur Verwendung bei – 80 °C gelagert.

4.6.2 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Für die Isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden 24 cm lange IPG-Streifen mit einem nicht linearen pH-Bereich von 3-11 (Immobiline Dry Strip, pH 3-11 NL, GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Die Streifen wurden mittels „Rehydration Loading“ mit 150 µg G-Dye markierten Proteinen beladen. Dies geschah in einem abgedunkelten Bereich ÜN in 450 µl Rehydrierungspuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % (w/v) Chaps, 1 % (w/v) Zwittergent, 1,2 % (v/v) DeStreak, 2 % (v/v) IPG-Puffer, Bromphenolblau). Um das Austrocknen der Streifen zu verhindern, wurden diese mit jeweils 3 ml ImmobilinedryStrip Cover Fluid (GE Healthcare, Freiburg) überschichtet. Für die IEF wurden die Streifen auf einen Keramikträger positioniert und in die Ettan IPGphorII (GE Healthcare, Freiburg) eingesetzt. Der Zusammenbau erfolgte nach Herstellerangaben. Für die IEF wurde folgendes Programm angewendet: 3 h 0-300 V, 4 h 300-600 V, 3 h 600-1000 V, 4 h 1000-8000 V, konstante 8000V bis zum Erreichen von 24.000V/h. Nach Beendigung der IEF wurden jeweils drei Streifen zunächst in 25 ml Äquilibrationpuffer (75 mM Tris/HCl pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, Bromphenolblau) mit 1 % (w/v) DTT und anschließend in 25 ml Äquilibrationpuffer mit 2,5 % (w/v) Jodacetamid für jeweils 20 min bei leichter Schüttelbewegung inkubiert.

4.6.3 Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE (2. Dimension)

In der zweiten Dimension wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht in 12,5 %-igen Polyacrylamid-Gelen (für 6 Gele: 189 ml Acrylamid, 113 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,5, 101 ml H₂O, 38 ml Rhinohide, 4,5 ml 10 % (w/v) -ige SDS-Lösung, 62 µl TEMED, 4,5 ml 10 % (w/v)-ige APS-Lösung) aufgetrennt, die mit einer *Ettan DaltSix Electrophoresis* Kammer (GE Healthcare, Freiburg) hergestellt wurden. Die äquilibrierten Streifen wurden auf die SDS-Gele transferiert und mit Agaroseversiegelungslösung (0,5 % (w/v) Agarose, Bromphenolblau in 1x SDS-Laufpuffer (2,5 mM Tris, 19,2 mM Glycin, 0,01 % (w/v) SDS) überschichtet. Als Größenstandard diente „Unstained Protein Molecular Weight Marker“ der Firma Thermo Scientific (Dreieich). Die SDS-PAGE erfolgte mit 1x SDS-Laufpuffer in der unteren und 2x SDS-Laufpuffer in der oberen Kammer. Nach Einlaufen der Proteine für 1 h bei 1 W/Gel erfolgte die Trennung nach dem Molekulargewicht für 4-5 h bei 15 W/Gel.

4.6.4 Detektion, Auswertung und Nachfärbung von G-Dye Proteingelen

2D-Gele mit G-Dye markierten Proteinen wurden direkt nach der Elektrophorese auf einem Typhoon 9410 Scanner (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) mit einer Auflösung von 100 µm visualisiert. Laser mit folgenden Wellenlängen wurden für die Detektion der unterschiedlich markierten Proteine verwendet: G-Dye 100: 488 nm (blau), G-Dye 200: 532 nm (grün) und G-Dye 300: 633 nm (rot). Die Laserempfindlichkeit wurde je nach Beladungsstärke des jeweiligen Gels eingestellt. Die Auswertung der G-Dye-Gele erfolgte mit Hilfe der DECODON Delta2D Software (Version 4.2, DECODON, Greifswald, Deutschland). Die Nachfärbung der Proteine geschah mit Coomassie Brilliant Blau G-250. Dazu wurden die 2D-Gele direkt nach dem Scannen für zwei Stunden in Fixierlösung (40 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure) geschwenkt und über Nacht in kolloidaler Coomassie Brilliant Blau Färbelösung (2 % (v/v) o-Phosphorsäure, 10 % (w/v) Ammoniumsulfat, 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250, 20 % (v/v) Methanol) inkubiert. Die Entfärbung der Gele erfolgte für 1-2 h in 25 % (v/v) Methanol.

4.6.5 Isolierung und Identifizierung von Proteinen aus 2D-Gelen

Um die angefärbten Proteine zu identifizieren, wurden diese aus den Coomassie -gefärbten Gelen ausgestochen und nach einem modifizierten Protokoll von Shevchenko *et al* (1996) tryptisch verdaut. Dazu wurden die Gele vorerst mehrfach mit Wasser gewaschen. Die ausgestochenen Gelstücke wurden anschließend mit 500 µl 50 mM NH_4HCO_3 /Acetonitril (1:1) für 15 min gewaschen. Es folgte ein Wechsel zwischen Zugabe und Abnahme von 100 µl Acetonitril und 100 µl 50 mM NH_4HCO_3 . Nach 15-minütiger Inkubation in 200 µl 50 mM NH_4HCO_3 /Acetonitril (1:1) wurde die gesamte Flüssigkeit abgenommen. Die Gelstücke wurden erneut mit 100 µl Acetonitril dehydriert, für 15 min getrocknet und mit 10 µl Trypsinlösung (20 µg/ml Trypsin (Promega, Mannheim) in 25 mM NH_4HCO_3) für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Entfernen der Flüssigkeit wurden 2-3 µl 25 mM NH_4HCO_3 hinzugefügt und die Ansätze über Nacht bei 37 °C verdaut. Am nächsten Tag wurde überschüssiges NH_4HCO_3 abgenommen und die Peptid-Fragmente wurden mit 10 µl Extraktionspuffer (0,1 % (v/v) TFA /Acetonitril, 1:1) durch 10-minütige Behandlung im Ultraschallbad und 10-minütiges Schütteln bei Raumtemperatur aus den Gelstücken extrahiert. Die Identifikation der Peptidfragmente erfolgte mittels Massenspektrometrie. Dazu wurden 1-3 µl tryptisch verdaute Proteinlösung mit 1 µl Matrixlösung (HCCA-TA30) auf eine MS-Target-Platte (MTP anchor chip 384, Bruker Daltonics, Bremen) aufgetragen und im Massenspektrometer (Ultima, Bruker Daltonics, Bremen) analysiert. Die erhaltenen Spektren wurden durch AspGD-Datenbanksuche mit dem Programm MASCOT 2.1.0 (Matrix Science, London,

Großbritannien) identifiziert, wobei ein „MASCOT score“ von $P < 0,05$ als statistische Signifikanzgrenze galt.

4.7 Flüssigverdau von Proteinen

Proteingemische für LC/MS-Analysen wurden mittels Speedvac komplett eingetrocknet und in 50 µl 50 mM NH_4HCO_3 (pH 8,0) aufgenommen. Zur Denaturierung der Proteine wurden 50 µl Trifluorethanol zugegeben und die Probe wurde für 20 min bei 90 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden 2,5 µl 200 mM DTT zugefügt und die Probe wurde für 20 min bei 50 °C inkubiert, um Disulfidbrücken zu reduzieren. Mittels Zugabe von 2,5 µl 1 M Jodacetamid und Inkubation für 20 min im Dunkeln erfolgte die Alkylierung der Thiolgruppen. Anschließend wurde die Konzentration von Trifluorethanol mit 20 mM NH_4HCO_3 (pH 8,0) auf eine Konzentration von 5 % reduziert. Die Zugabe von Trypsin (1 µg/µl 20 mM NH_4HCO_3 (pH 8,0)) erfolgte in einem Verhältnis von 1:40 (Trypsin:Protein). Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei 37 °C wurden 5 µl 280 mM Ameisensäuren zugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Das Peptidgemisch wurde vollständig eingetrocknet, in 20 µl 0,05 % (v/v) TFA/ 2 % (v/v) Acetonitril aufgenommen und bis zur LC/MS-Analyse bei -20 °C gelagert.

5 Analytische Methoden

5.1 „High-Performance Liquid Chromatography“(HPLC)-Analysen

Die Analyse verschiedener Kulturüberstände erfolgte mit einem Shimadzu LC-10Avp series HPLC-System und einer C18-Säule (Eurospher 100-5, 250x4,6 mm) mittels Gradientenelution (MeCN/0,1 % (v/v) TFA 0,5/99,5 in 30 min auf MeCN/0,1 % (v/v) TFA 100/0, MeCN 100 % für 10 min) bei einer Durchflussrate von 1 ml/min. Dafür wurden die Überstände mit Ethylacetat extrahiert, mit Natriumsulfat getrocknet, unter geringem Druck aufkonzentriert und in 1 ml Methanol aufgenommen.

5.2 LC-MS/MS-Bestimmung

Die tryptischen Peptide wurden mit einer Ultimate 3000 nano RSLC (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) flüssigchromatografisch aufgetrennt und mit einem Q-TOF-System (Bruker micrOTOF-Q, Bremen, Deutschland) tandemmassenspektrometrisch detektiert. Dafür wurden zunächst bis zu 4 µl einer Probe in das System injiziert und mit 0,05 % (v/v) TFA in 2/98 ACN/ H_2O bei einer Flussrate von 5 µl/min auf einer nanoTrap-

Säule (Acclaim PepMap 100, 20 mm x 75 µm ID, 3 µm Partikelgröße) angereichert und entsalzt. Die Elution von der Anreicherungssäule auf die Trennsäule erfolgte durch eine Ventilschaltung 4 min nach der Injektion, wodurch der Fluss der Ladepumpe in den Abfall geleitet wird und ein Elutionsgradient der binären Nanopumpe die Peptide mit Hilfe der mobilen Phase (Eluent A: 0,1 % (v/v) Ameisensäure in H₂O; Eluent B: 0,1 % (v/v) Ameisensäure in 90/10 Acetonitril/H₂O) von der Anreicherungssäule auf die analytische Trennsäule (Acclaim PepMap RSLC, 150 mm x 75 µm ID, 2 µm Partikelgröße) eluiert und physikochemisch (hydrophobe Wechselwirkungen) auftrennt. Die Gradientenelution wurde wie folgt gewählt: 0-4 min 4 % Eluent B, 36 min 35 % B, 40 min 50 % B, 41-45 min 90 % B, 45, 1-60 min 4 % B. Die Software-Steuerung erfolgte über Chromeleon (Thermo/Dionex, Dreieich, Deutschland).

Derart aufgetrennte Peptide wurden in das Massenspektrometer geleitet und mit Hilfe einer nanoESI-Online-Ionenquelle (Bruker Daltonik, Bremen) unter Verwendung einer Kapillarspannung von 2,5 kV und einer Endplattenspannung von 500 V positiv ionisiert. Als Trocknungsgas wurde Stickstoff mit einer Flussrate von 3 l/min und einer Temperatur von 150 °C verwendet. Das Massenspektrometer wurde mit der Software OTOFcontrol (Compass 1.5, Bruker) gesteuert. Die 10 intensivsten tryptischen Peptide je Scan-Zyklus (Top10-Methode) wurden mittels *data-dependent acquisition* (DDA) im ersten Massenanalysator (Quadrupole) zur Fragmentierung in der nachgeschalteten CID-Kollisionszelle selektiert. Argon wurde als inertes Kollisionsgas genutzt. Die Kollisionsenergie betrug je nach Ladung und Masse zwischen 12 und 45 V. Die erhaltenen Fragment-Ionen wurden hochauflösend im zweiten Massenanalysator nach der Flugzeit (time of flight, TOF) aufgetrennt und spektrometrisch detektiert. Precursor-Ionen wurden in einem Massenfenster von m/z 350-1600 amu gescannt während MS/MS-Spektren im Bereich von m/z 50-2600 amu detektiert wurden. Einmal fragmentierte Precursor-Ionen wurden für 30 s blockiert, damit auch weniger abundante Peptide detektiert werden konnten. Die MS-Spektrenrate wurde auf 1 Hz eingestellt, während die MS/MS-Spektrenrate je nach Intensität des Precursor-Ions in einem dynamischen Bereich von 1-2 Hz detektiert wurde. Eine 15-Massenpunkt-Kalibrierung erfolgte wöchentlich mit Hilfe eines NaTFA-Clusters.

Die Datenauswertung erfolgte mittels Data Analysis (Compass 1.5, Bruker) und Proteinscape 3.0. Dazu wurde der Such-Algorithmus von Mascot (Matrix Science, London, UK) angewendet. Es wurde maximal ein *missed cleavage* (unvollständiger tryptischer Verdau) im Rahmen der Datenbanksuche akzeptiert. Die Massentoleranz wurde für die Precursor-Ionen auf 100 ppm begrenzt. Für die MS/MS-Toleranz wurden weniger als 0,2 Da akzeptiert. Ausschließlich solche Proteine wurden als Proteinhit anerkannt, für die mindestens 2 Peptide

detektiert worden waren. Diese Peptide mussten Rank1-Peptide sein und einen Mascot-Score von >21 aufweisen. Ein ProteinScore >54 (Summe aus Peptid-basiertem Mascot-Score) wurde als signifikant eingestuft, wenn die Vorbedingungen erfüllt waren. Als Modifikationen wurden eine statische Carbamidomethylierung der Cystein-Reste (Alkylierung durch Iodacetamid) und eine variable Oxidation der Methionin-Reste berücksichtigt. Als Datenbank wurde die Proteindatenbank von *Aspergillus nidulans* FGSC A4 der *Aspergillus*-Genom-Datenbank (www.aspgd.org) verwendet und die Sequenz von Venus eingepflegt.

5.3 Proteinreinigung mittels ÄKTA

Die Aufreinigung von Proteinen wurde mit einem ÄKTA-Explorer Chromatographiesystem (GE Healthcare) durchgeführt. Während der Reinigung wurden A_{280} , Leitfähigkeit und pH-Wert kontinuierlich gemessen.

5.3.1 Reinigung von HapY

Der Proteinextrakt (200 ml) wurde mit einem Fluss von 5 ml/min auf eine mit Puffer A (20 mM HEPES pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM DTT) äquilibrierte 5 ml His Trap FF (GE Healthcare) aufgetragen. Die Säule wurde mit 20 SV 5 % Puffer B (50 mM HEPES pH 8,0, 500 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, 250 mM Imidazol, 1 mM DTT) gewaschen. Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit einem Gradienten von 5 % - 100 % Puffer B in 20 SV eluiert. Die Peakfraktionen wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert.

Die Fraktionen, die das rekombinante Protein enthielten, wurden vereint und mittels Amicon Ultra-15 (30K) durch 2,5 stündige Zentrifugation bei 4000 x g, 16 °C auf ein Volumen von 3 ml eingengt. Die 3 ml Probe wurde mit 0,5 ml SEC Puffer (20 mM HEPES, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM DTT) versetzt und auf eine Gelfiltrationssäule (Superdex200PG16/60, GE Healthcare) aufgetragen.

5.3.2 Reinigung von GcnE

Der Proteinextrakt wurde mit 300 ml Puffer A (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA) verdünnt und mit einem Fluss von 10 ml/min auf eine äquilibrierte 50 ml Dextrin-Sepharose-Säule (GE Healthcare) aufgetragen. Anschließend wurde mit 4 SV Puffer A gewaschen. Das Protein wurde mit 100 % Puffer B (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Maltose) von der Säule eluiert. Die Peakfraktion wurde aufgefangen, mittels SDS-PAGE analysiert und weiter verarbeitet.

Es folgte eine 2,5 stündige Spaltung mit TEV-Protease bei RT. Zur Abtrennung des Maltose-Bindeproteins (MBP) von dem rekombinanten GcnE wurde die Probe mit einer Flussrate von 10 ml/min auf eine 25 ml Ni-Sepharose-Säule aufgetragen. Nachdem die Säule mit 3 SV Puffer A (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl) gespült wurde, folgte die Elution des MBP mit 100 % Puffer B (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 200 mM Imidazol). Sowohl der Durchlauf als auch das Eluat wurden fraktioniert gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert.

6 Mikroskopie

Die Anzucht mikroskopischer Präparate erfolgte in 24-well Platten auf Deckgläschen. Es wurden 300 µl Medium mit 10^5 Sporen/ml in ein Well gegeben und ca. 14 h bei 37 °C inkubiert. Die Präparate wurden mit 3 % (v/v) Formaldehyd 30 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Präparate mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die trockenen Deckgläschen wurden auf einen Objektträger mit einem Tropfen Roti®-Mount FluorCare DAPI (Carl Roth, Karlsruhe) für die Zellkernfärbung gegeben. Nach ca. 10 min Inkubation im Dunkeln wurden die Präparate mit einem „Zeiss Imager.M2 Axio Fluoreszenzmikroskop“ analysiert. Die Aufnahmen wurden mit der „Zeiss AxioCam MRm“ Kamera gemacht.

Die Fluoreszenzanalyse der isolierten Zellkerne wurde mit einem „Leica DM 4500B Fluoreszenzmikroskop“ (Leica Microsystems, Wetzlar) durchgeführt. Die Bilder wurden mit einer „Leica DFC 480“-Kamera (Leica Microsystems, Wetzlar) aufgenommen.

7 Datenbanken

Sequenzinformationen wurden von AspGD (*Aspergillus* Genome Database; www.aspgd.org) bezogen. Für die Suche nach homologen Genen oder Proteinen in anderen Organismen diente das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

ERGEBNISSE

1 Analyse auf mögliche Interaktionspartner des CBC

Der CCAAT-Bindekomplex (CBC) aus *A. nidulans*, bestehend aus den drei Untereinheiten HapB, HapC und HapE, ist ein gut charakterisierter Transkriptionsfaktor. In verschiedenen Arbeiten (Kato *et al*, 1997; Litzka *et al*, 1998; Steidl *et al*, 1999) gibt es jedoch Hinweise auf zusätzliche unbekannte Bindungspartner des CBCs. Zur Identifikation möglicher Interaktionspartner sollten Koimmunopräzipitations-Analysen durchgeführt werden. Dafür wurden zunächst entsprechende Stämme hergestellt.

1.1 Deletion von *hapC* und phänotypische Charakterisierung der Mutante

Zur Herstellung von Deletionskonstrukten in *A. nidulans* wurde die sogenannte Drei-Fragment-PCR verwendet, welche am Beispiel der Deletion von *hapC* kurz erklärt wird. In drei separaten PCR's wurden mit Hilfe der Primerpaare *hapC* up for/ *hapC* up rev, *hapC* down for/ *hapC* down rev und Huga-luc_*argB* for/Huga-luc_*argB* rev die 5'-Flanke und die 3'-Flanke des *hapC*-Gens und die Selektionsmarkerkassette *argB* amplifiziert. *argB* kodiert für das Enzym Ornithin-Transcarbamylase, welches an der Biosynthese von Arginin beteiligt ist (Lenouvel *et al*, 2002; Serlupi-Crescenzi *et al*, 1983). Für die Amplifikation der *hapC*-Genflanken und der *argB*-Kassette diente genomische DNA bzw. das Plasmid pLUC-TargB03seq als Matrize. Die flankierenden Bereiche von *hapC* enthalten an der einander zugewandten Seite einen zur *argB*-Kassette überlappenden Bereich von 25 Basenpaaren Länge. In einer weiteren PCR wurden die 3'-Flanke, die 5'-Flanke und die *argB*-Kassette als Matrizen eingesetzt und mit Hilfe der äußersten Primer *hapC* up rev und *hapC* down for amplifiziert. Durch die überlappenden Sequenzen entsteht aus diesen 3 Fragmenten ein großes DNA-Fragment, welches für die Transformation von *A. nidulans* RMSO11/A1153 eingesetzt wurde. Durch homologe Rekombination am Genlokus wurde *hapC* gegen die *argB*-Kassette ausgetauscht, wodurch ein Arginin-auxotropher Stamm Arginin-prototroph wurde.

Putative Transformanten wurden drei Mal auf Selektionsmedium ausgestrichen und anschließend mittels Southern Blot analysiert (Abbildung 4). Hierfür wurde genomische DNA der Transformanten und des *A. nidulans* Wildtyps mit dem Restriktionsenzym *Pst*I verdaut. Das veränderte Schnittbild weist eine erfolgreiche Deletion des Gens *hapC* nach.

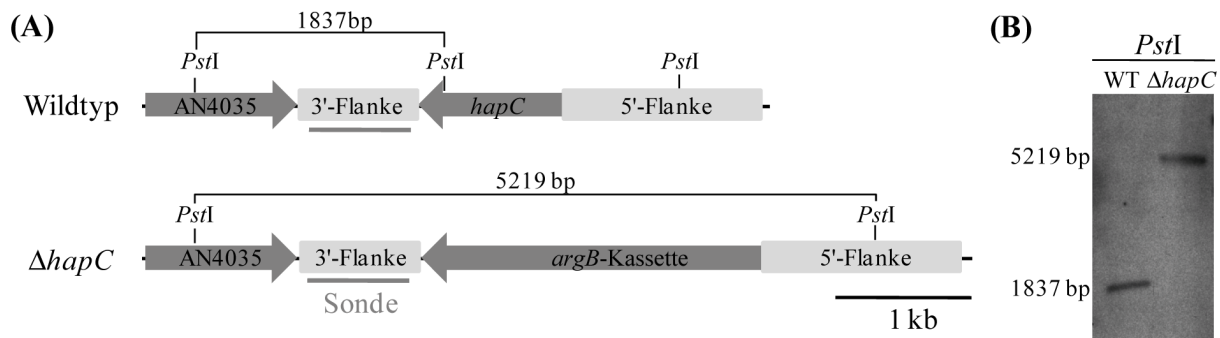


Abbildung 4: Schematische Darstellung der *hapC*-Deletion in *A. nidulans* RMSO11 (Wildtyp) (A) und die dazu gehörige Southern Blot-Analyse (B). (A) Die kodierende Sequenz von *hapC* wurde mit Hilfe der *argB*-Kassette deletiert. (B) Die Southern Blot-Analyse wurde mit *PstI* verdauter genomischer DNA und der in der Abbildung (A) angedeuteten Sonde durchgeführt, welche mittels PCR und den Oligonukleotiden *hapC* down for/*hapC* down rev (Tabelle 6) hergestellt wurde.

Der erhaltene $\Delta hapC$ -Stamm zeigte den bereits beschriebenen Phänotyp (Papagiannopoulos *et al*, 1996). Im Vergleich zum Wildtyp wies der $\Delta hapC$ -Stamm ein sehr schlechtes Wachstum auf allen getesteten Medien auf (Abbildung 5B). Besonders auffällig ist das verlangsamte Wachstum in Gegenwart von oxidativen Stress induzierenden Substanzen wie Menadion und H_2O_2 , dem Eisenchelator BPS (Coward *et al*, 1993), $CoCl_2$, durch das hypoxische Bedingungen nachgeahmt werden (Lee *et al*, 2007), Acetamid als einzige N- und C-Quelle und unter geringer Sauerstoffkonzentration (Abbildung 5B). Der Deletionsstamm besitzt eine deutlich reduzierte Konidienbildung, welche zusätzlich in ihrer Pigmentierung gestört sind (Abbildung 5A). Des Weiteren ist der *hapC*-Stamm in seinem sexuellen Entwicklungszyklus gestört. Er ist zwar in der Lage Hülle Zellen zu produzieren, jedoch kann er keine reifen Kleistothezien mehr bilden (Abbildung 5A). Da der *hapC*-Stamm in Flüssigkulturen einen gravierenden Wachstumsdefekt auf Nitrat zeigte, wurde als Stickstoffquelle immer Glutamin gewählt.

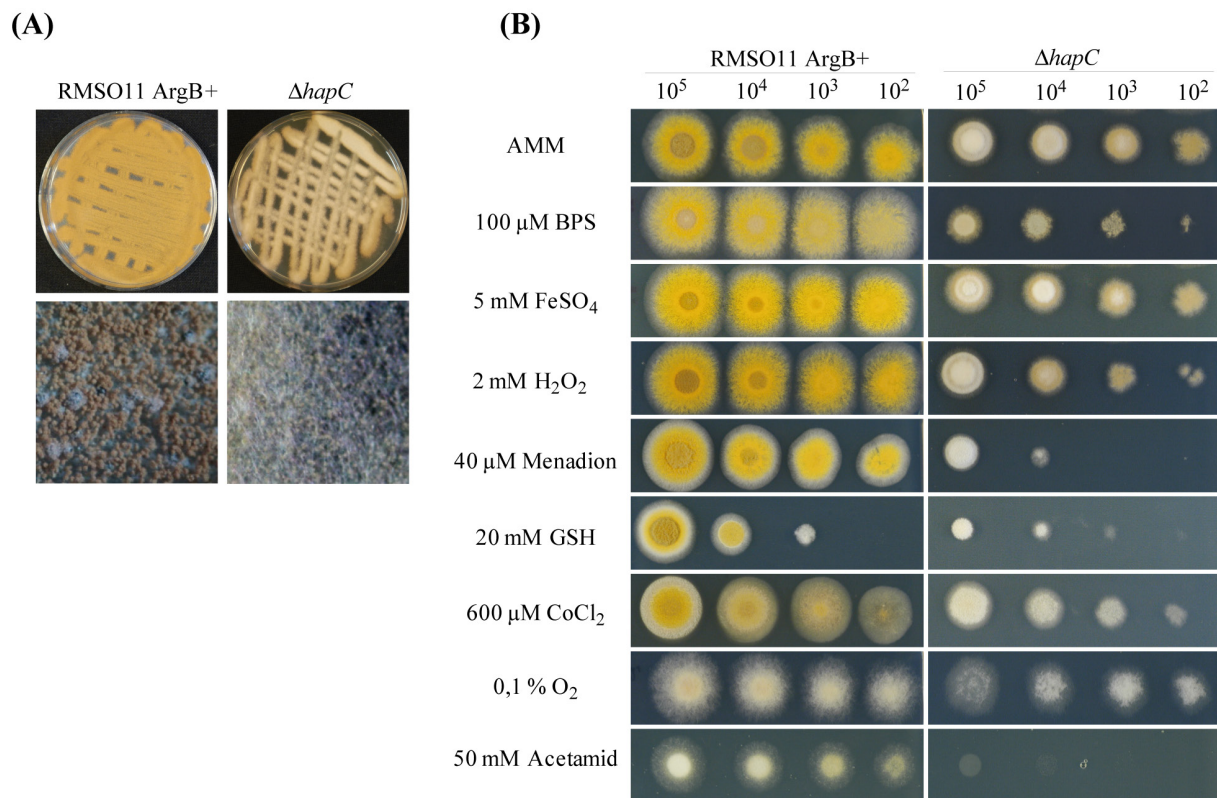


Abbildung 5: Phänotypische Charakterisierung der $\Delta hapC$ -Mutante. (A) Aufsicht und mikroskopische Aufsicht auf Agarplatten, bewachsen durch die Stämme RMSO11 ArgB+ (WT) und $\Delta hapC$. (B) Je 10^5 - 10^2 Konidien des Wildtyps (RMSO11 ArgB+) sowie der Deletionsmutante ($\Delta hapC$) wurden auf AMM, AMM mit 100 μ M BPS/ 5 mM FeSO₄/ 2 mM H₂O₂/ 40 μ M Menadion/ 20 mM GSH/ 600 μ M CoCl₂ /50 mM Acetamid als einzige N-und C-Quelle aufgetropft und bei 37 °C für 2-3 Tage inkubiert.

1.2 Komplementation der $\Delta hapC$ -Mutante und Lokalisationsstudien zu HapC

Die Komplementation der $\Delta hapC$ -Mutante erfolgte mit einer HapC^{Venus} Fusion. Das gelb fluoreszierende Protein „Venus“ ist eine Mutantenversion des „Grün Fluoreszierenden Proteins“ (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* (Nagai *et al*, 2002). Es wird als Reporterprotein für Lokalisationsstudien eingesetzt.

Für diese Zwecke wurden zwei Standard-Plasmide generiert, wobei eines für eine C-terminale Venus Fusion (Abbildung 6A) und ein weiteres für eine N-terminale Venus Fusion kodiert (Abbildung 6B). Als Grundplasmid diente pSK275, welches eine Ampicillin-Resistenz trägt und die Pyrithiamin-Kassette enthält. Mit Hilfe des Primerpaares *nosTXmaI* for/ *nosTPstI* rev und dem Plasmid pUC-GH wurde der Nopalin-Synthase-Terminator amplifiziert und über die Schnittstellen *XmaI*/*PstI* in das Plasmid pSK275 kloniert. Weiterhin wurde mit dem Primerpaar *SpeI*-linker-Venus for/ *XmaI*-Venus rev und dem Plasmid 1049975 Venus pMA das Fragment linker^{Venus} amplifiziert. Dieses wurde über die Restriktionsenzyme *SpeI*/*XmaI* in den zuvor erhaltenen Zwischenvektor kloniert. Es entstand das Plasmid plinker^{Venus}-ptrA. Für das Plasmid zur N-terminalen Venus-Fusion wurde das Venus¹linker DNA-Fragment mit Hilfe

des Primerpaares Venus*NotI* for/ Venuslinker*SpeI* rev und dem Plasmid 1049975 Venus pMA amplifiziert und über *NotI*/ *SpeI* in den zuvor erhaltenen Zwischenvektor kloniert. Das entstandene Plasmid wurde p^{Venus}linker-*ptrA* genannt (Abbildung 6).

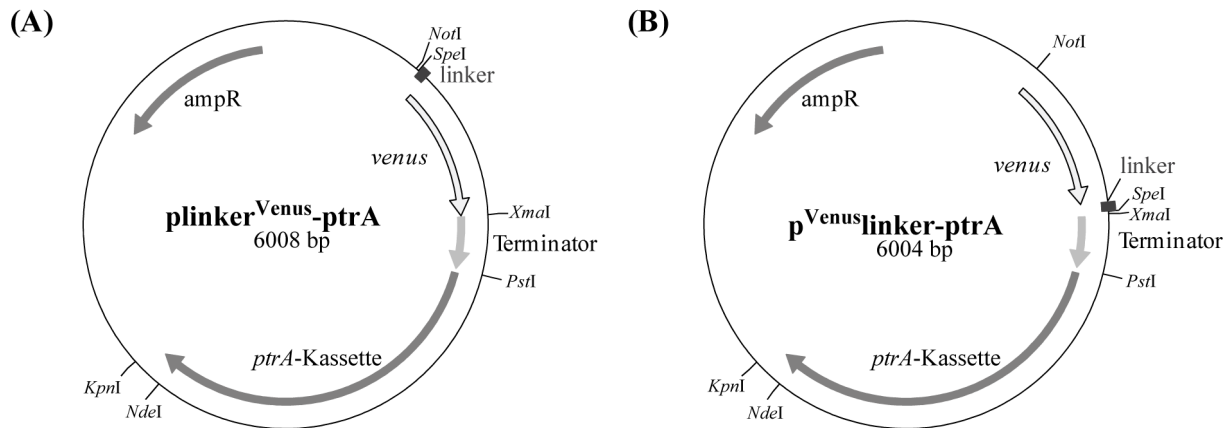


Abbildung 6: Standard-Plasmide für eine C-terminale (A) und eine N-terminale Venus-Fusion (B). Die Plasmide tragen *ptrA* als Resistenzmarkergen. Vor (A) bzw. nach (B) dem Gen, welches für Venus kodiert, befindet sich ein linker mit der Aminosäuresequenz GGGSGGGSGGGGS. 3'-seitig schließt sich die Terminator-Region des *nos*-Gens an.

Für die Komplementation der $\Delta hapC$ -Mutante wurde das Plasmid $phapC^{Venus}$ -*ptrA* (Abbildung 7A) erzeugt, welches die vollständige genomische Sequenz von *hapC*, den nativen Promotor und die 3'-Flanke des *hapC*-Gens enthält. Hierfür wurde mittels des Primerpaares AN4034 up+*hapCNotI* for/ AN4034 up+*hapCSpeI* rev und genomischer DNA von *A. nidulans* das *hapC*-Gen mit zugehörigem Promotor amplifiziert und mit Hilfe der Enzyme *NotI*/ *SpeI* in den Vektor plinker^{Venus}-*ptrA* kloniert, um eine C-terminale Venus-Fusion zu erhalten. Weiterhin wurde mit dem Primerpaar AN4034 down*KpnI* for/ AN4034 down*KpnI* rev und genomischer DNA die 3'-Flanke von *hapC* vervielfältigt und über das Enzym *KpnI* in richtiger Orientierung in den zuvor erhaltenen Vektor gebracht.

Für eine zielgerichtete Integration am *hapC*-Lokus der $\Delta hapC$ -Mutante wurden 10 µg Plasmid-DNA mit *SnaBI* linearisiert und in den $\Delta hapC$ -Stamm transformiert. Aufgrund der Pyrithiamin-Resistenzkassette wurden die Transformanten auf Medium mit 0,1 mg/ml Pyrithiamin selektioniert. Putative Transformanten wurden mittels Southern Blot identifiziert. Hierfür wurde genomische DNA vom Wildtyp RMSO11, von der $\Delta hapC$ -Mutante und der *hapC^{Venus}* Komplementation mit *PstI* restringiert. Das erhaltene Schnittbild bestätigt eine erfolgreiche Komplementation durch das linearisierte Plasmid am *hapC*-Lokus (Abbildung 7B). Mittels einer Northern Blot-Analyse konnte ebenfalls das Transkript der Fusion nachgewiesen werden (Abbildung 7C).

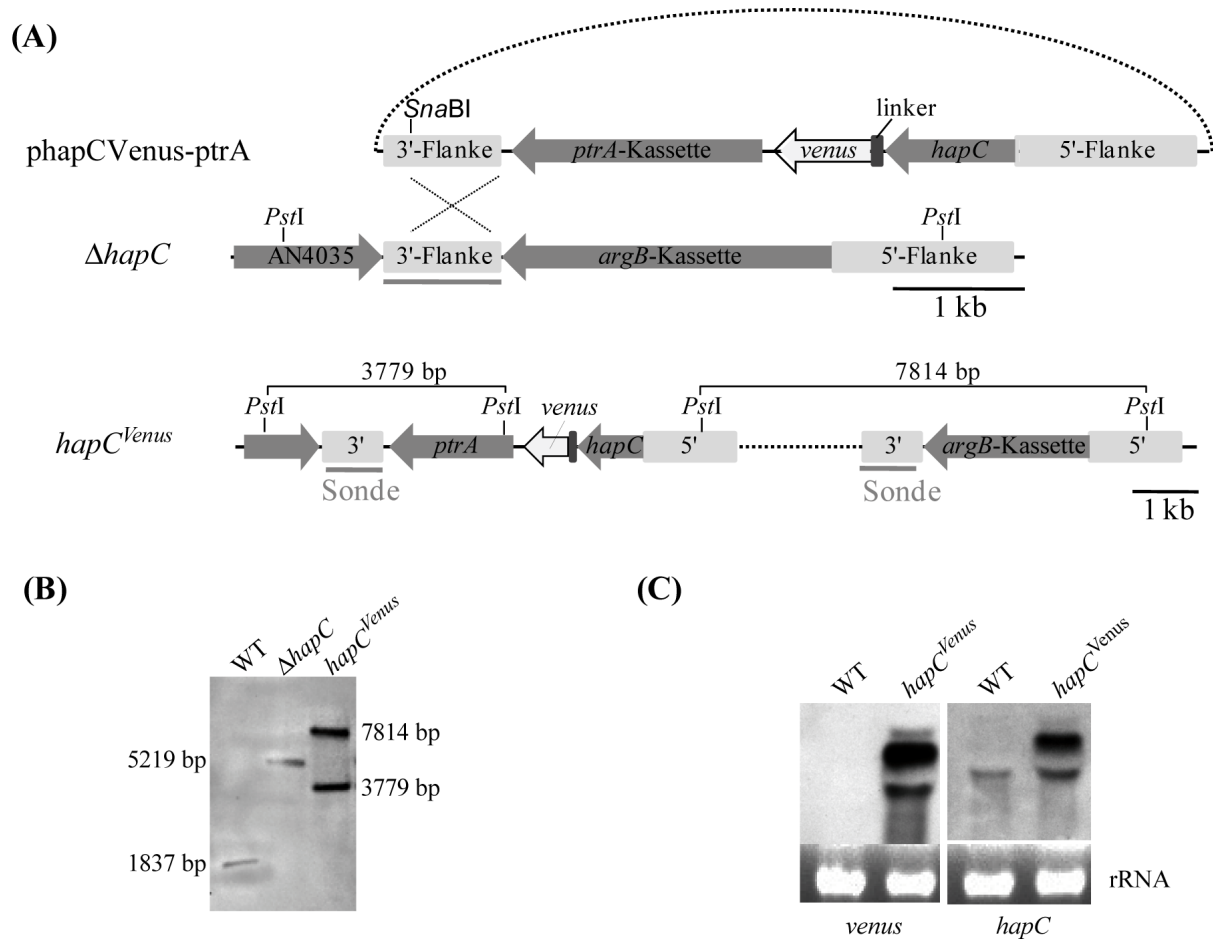


Abbildung 7: Schematische Darstellung der zielgerichteten Integration des Plasmids phapCVenus-*ptrA* in das Genom der $\Delta hapC$ -Mutante (A) mit zugehöriger Southern Blot- (B) und Northern Blot-Analyse (C). (A) Integration des mit *Sna*BI linearisierten Plasmids phapCVenus-*ptrA* am *hapC*-Genlokus der $\Delta hapC$ -Mutante. (B) Die Southern Blot-Analyse wurde mit *Pst*I verdauter genomischer DNA und der in Abbildung (A) angedeuteten Sonde durchgeführt, welche mittels PCR und den Oligonukleotiden *hapC* down for/ *hapC* down rev (Tabelle 6) hergestellt wurde. (C) Northern Blot-Analyse mit Hybridisierungssonde gegen *venus* und *hapC*. Als Ladekontrolle ist die 18S-rRNA dargestellt (unten).

Durch die Komplementation der $\Delta hapC$ -Mutante mit *hapC*^{Venus} konnte der Wildtyp-Phänotyp vollständig wieder hergestellt werden (Abbildung 8A). Durch die Fusion mit Venus konnte mittels mikroskopischer Analyse eine eindeutige Kernlokalisierung für HapC (Abbildung 8B) gezeigt werden.

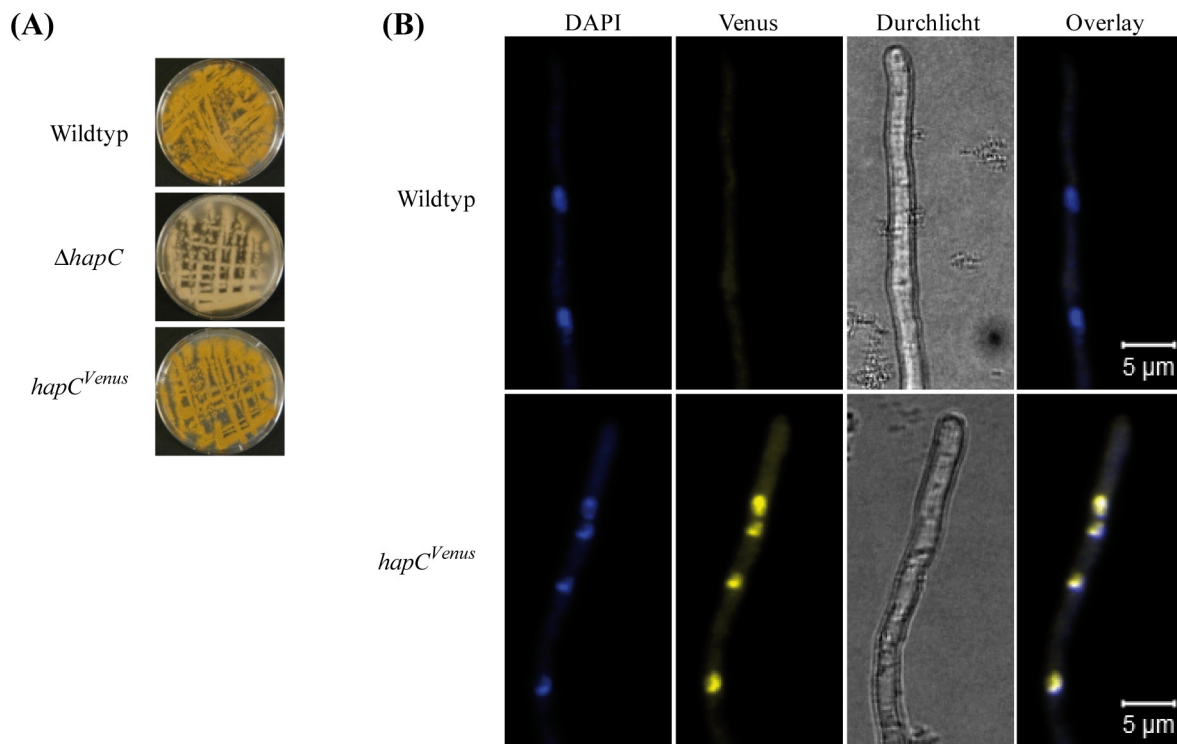


Abbildung 8: Phänotyp der *hapC*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (A) und Lokalisation von HapC^{Venus} (B). (A) Aufsicht auf Agarplatten des Wildtyps (RMS011 ArgB⁺) und der *hapC*-Mutanten. (B) Mikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung 63-fach) des Wildtyps und der *hapC^{Venus}*-Komplementation. Die Stämme wurden 14 h auf Deckgläschen in 24-well Platten und 300 µl AMM kultiviert und anschließend wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt. Es ist jeweils in der ersten Spalte die DAPI-Färbung, in der zweiten Spalte die Venus-Fluoreszenz, in der dritten Spalte eine Durchlicht Aufnahme und in der letzten Spalte ein Overlay aus DAPI-Färbung und Venus-Fluoreszenz dargestellt.

1.3 Zellkernisolierung und Koimmunopräzipitation von HapC^{Venus}

Ziel der Koimmunopräzipitation von HapC^{Venus} war es, den gesamten CBC, bestehend aus seinen drei Untereinheiten HapB, HapC und HapE zusammen mit potentiellen Interaktionspartnern zu isolieren. Dazu wurden zunächst die Zellkerne von *A. nidulans* Wildtyp (RMS011 Arg⁺) und der Mutante *hapC^{Venus}* isoliert. Hierfür wurde Myzel aus 24 h Flüssigkulturen verwendet. Mikroskopische Analysen bestätigten eine erfolgreiche Isolierung intakter Zellkerne (Abbildung 9). Mit den daraus gewonnenen Proteinextrakten und GFP-bindender Agarose wurde die Koimmunopräzipitation durchgeführt.

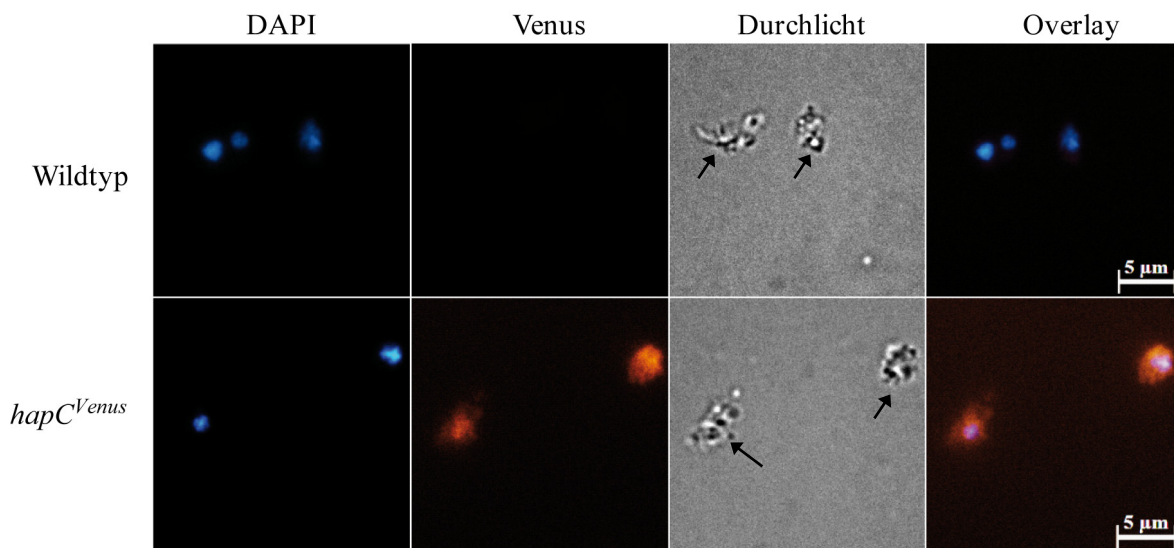


Abbildung 9: Mikroskopische Analyse der Zellkernisolation. Nach der Isolation der Zellkerne aus dem Wildtyp RMSO11 ArgB+ und der *hapC^{Venus}*-Komplementationsmutante wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt. Dargestellt sind die Aufnahmen (Vergrößerung 100-fach) der DAPI-Färbung, der Venus-Fluoreszenz, eine Durchlicht Aufnahme und das Overlay von DAPI-Färbung und Venus-Fluoreszenz. Die schwarzen Pfeile markieren die Zellkerne.

Nach zweistündiger Inkubation der Zellkernproteinextrakte mit der GFP-bindenden Agarose wurde diese mehrfach gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution der gebundenen Proteine. Die Eluate wurden mit Trypsin verdaut und die daraus resultierenden Proben mittels LC-MS/MS-Analyse untersucht. In den Wildtyp-Proben konnten mittels LC-MS/MS-Analyse und SDS-PAGE keine Proteine detektiert werden (Abbildung 10A), d. h. es gibt keine unspezifischen Bindungen der Zellkernproteine an die GFP-bindende Agarose. In den Proben des *hapC^{Venus}*-Stammes konnten alle drei CBC-Untereinheiten HapB, HapC und HapE identifiziert werden (Abbildung 10A). Außerdem wurden alle vier Kernhistone des Nukleosoms gefunden, H2A, H2B, H3 und H4. In *A. nidulans* gibt es je ein Gen, welches für H2B und H3 kodiert und je zwei Gene, die für H2A (H2A.X und H2A.Z) und H4 (H4.1 und H4.2) kodieren. Auffällig bei den Ergebnissen der LC-MS/MS-Analyse war, dass in allen Replikaten nur H2A.X und H4.1 gefunden wurden. Des Weiteren wurde ein bisher uncharakterisiertes Protein mit der Lokusnummer AN8826 identifiziert. Dieses Protein besitzt ein Molekulargewicht von 37,5 kDa und wird fortan HapY genannt. Die Masse von HapY entspricht etwa der fehlenden Unbekannten des CBCs, die aufgrund von Gelfiltrationsexperimenten postuliert wird (Litzka *et al*, 1998). Ferner wurden in EMSA-Studien zwei DNA-Komplexe für den CBC detektiert (Steidl *et al*, 1999). Diese Beobachtung lässt ebenfalls vermuten, dass der Komplex mindestens einen weiteren Bindungspartner besitzt.

Zusätzlich zur LC-MS/MS-Analyse wurden mit den Eluaten der Koimmunopräzipitation eine SDS-PAGE-Analyse mit anschließender Silberfärbung (Abbildung 10A) und eine Western Blot-Analyse mit einem GFP-Antikörper durchgeführt (Abbildung 10B). Die markierten Banden in Abbildung 10A wurden aus einem Coomassie gefärbten Gel ausgeschnitten, im Gel mit Trypsin verdaut und ebenfalls mittels LC-MS/MS analysiert. Es wurden die gleichen Proteine identifiziert, wie schon mit der gelfreien Methode. Die Ergebnisse sind in der Tabelle in Abbildung 10A dargestellt.

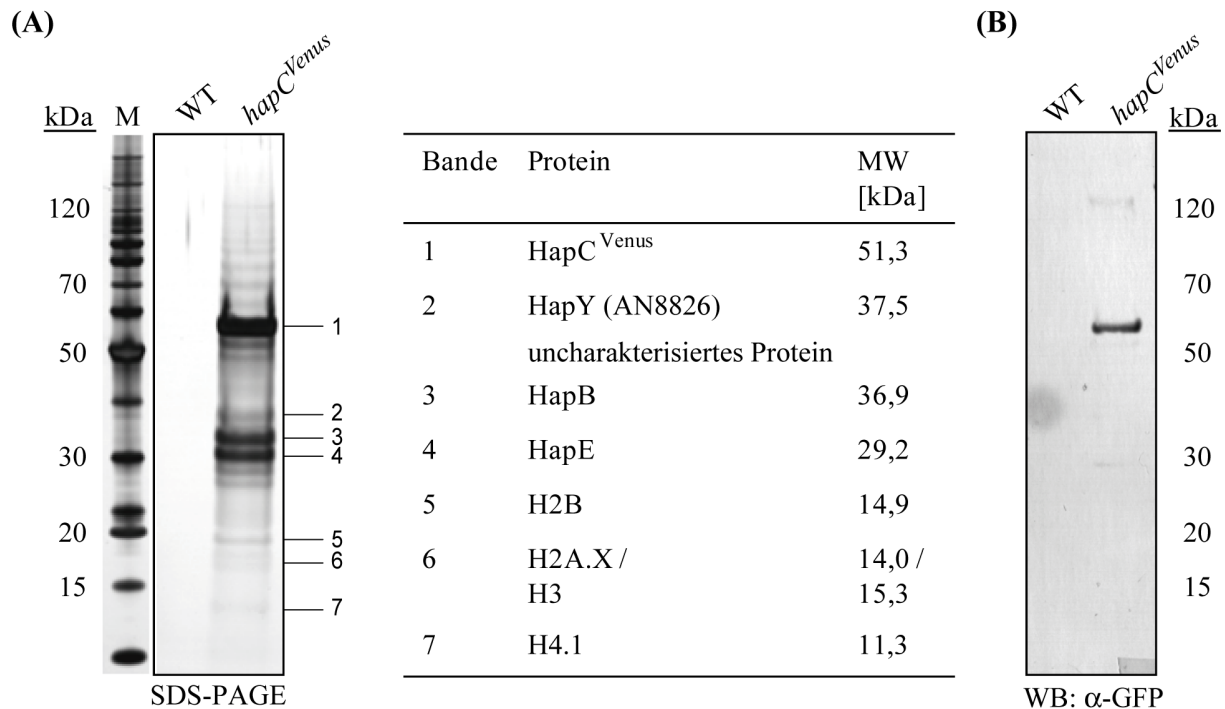


Abbildung 10: SDS-PAGE (A) und Western Blot-Analyse (B) der koimmunopräzipitierten Kernextrakte. (A) SDS-PAGE mit anschließender Silber-Färbung. Es wurden 2 µg Protein des GFP-Trap Eluats des *hapC^{Venus}*-Stammes aufgetragen. Als Marker wurde der BenchMark (life Technologies) verwendet. In der benachbarten Tabelle sind die Ergebnisse der Analyse der Proteinbanden dargestellt. (B) Western Blot-Analyse der GFP-Trap Eluate. Es wurden 600 ng Protein aufgetragen. Das HapC^{Venus}-Protein wurde mit Hilfe eines monoklonalen GFP-Antikörpers detektiert.

1.4 Deletion eines potentiellen CBC-Bindungspartners und Charakterisierung der Mutante

Das mit dem CBC koimmunopräzipitierte Protein HapY ist in allen *Aspergillus spp.* als uncharakterisiertes Protein annotiert. BLAST-Analysen haben ergeben, dass es sich um ein für Ascomyceten spezifisches Protein handelt. Es besitzt eine konservierte sogenannte AT-hook-Domäne, welche an AT-reiche DNA-Regionen bindet. Diese Domäne kodiert gleichzeitig für ein Kernlokalisierungssignal. AT-hook-Domänen wurden erstmals für *High Mobility Group* (HMG) Proteine der Gruppe A (HMGA) beschrieben. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass es zwischen dem humanen NF-Y-Komplex und den *High Mobility*

Group Proteinen HMG-I eine Interaktion gibt (Currie, 1997; Liberati *et al*, 1998b). Jedoch handelt es sich bei HapY nicht um ein konserviertes HMGA-Protein, weil diese in der Regel drei AT-hook-Domänen enthalten. In dem Protein HapY wurde nur eine AT-hook-Domäne identifiziert (Abbildung 11). Ferner handelt es sich bei HapY um ein Prolin-reiches und stark basisches Protein. Außer, dass Proline für die Struktur von Proteinen nur eine geringe Rolle spielen, ist bisher nur sehr wenig über Prolin-reiche Proteine bekannt (Williamson, 1994).

>HapY (341 Aminosäuren davon 16,4 % Prolin)

```

MSHSREKTWTEDEKYALLTEILKKGGVSSLELVNIIKAMNIHPSWADIPLPSGRSLNSCQ 60
SVFHEMCQELASQVNTRFGPIHPPRHAPAPAQSVLPDSNNSARKRPLYPTDKPILAPRAI 120
QPRPPAGEASYSSSGASTMLSPGTGDVPGATEPPRKRGRPTKLEAERRKAEAEARGVLY 180
QPQSRQRGSQKAKAPSTPTSPSGVEAGGTVYTQTSNRPPLIPPPGLHYVHPPLRSMPLPG 240
SSDEERMRTMPNQISFALRELPRPQETRQTLPSPHALQLGHRESIPRIEFGDRPYEPLPP 300
ERLTFTDSSRRSLVNPPPRPPDEFHTPDKQIPLTTTAEKRT 341

```

AT-hook Domäne

Kernlokalisationsignal

Prolin-reich

Abbildung 11: Aminosäuresequenzanalyse von HapY. Die unterstrichene Sequenz stellt die AT-hook-Domäne dar. Die hell grau unterlegten Aminosäuren bilden das Kernlokalisationsignal. Die dunkel grau unterlegten Aminosäuren kennzeichnen Proline.

Die Relevanz von HapY für *A. nidulans* wurde durch die Deletion des Gens untersucht. Hierfür wurden mit Hilfe der Primerpaare AN8826 up for/ AN8826 up rev und AN8826 down for/ AN8826 down rev die 5'-Flanke und die 3'-Flanke des *hapY*-Gens amplifiziert und wie unter 1.1 beschrieben die *argB*-Kassette. Mittels der Drei-Fragment-PCR wurde aus den drei Einzelfragmenten das Deletionskonstrukt hergestellt. Nach der Transformation der DNA in den Arginin-auxotrophen *A. nidulans*-Stamm A1153 sollte es zu einem homologen Doppel-*Crossing over* am *hapY*-Lokus kommen und somit zu einem Austausch des Gens gegen die *argB*-Kassette (Abbildung 12A). Die Arginin-prototrophen Transformanten wurden mittels Southern Blot analysiert. Das erhaltene Bandenmuster in Abbildung 12B bestätigte die erfolgreiche Deletion des *hapY*-Gens.

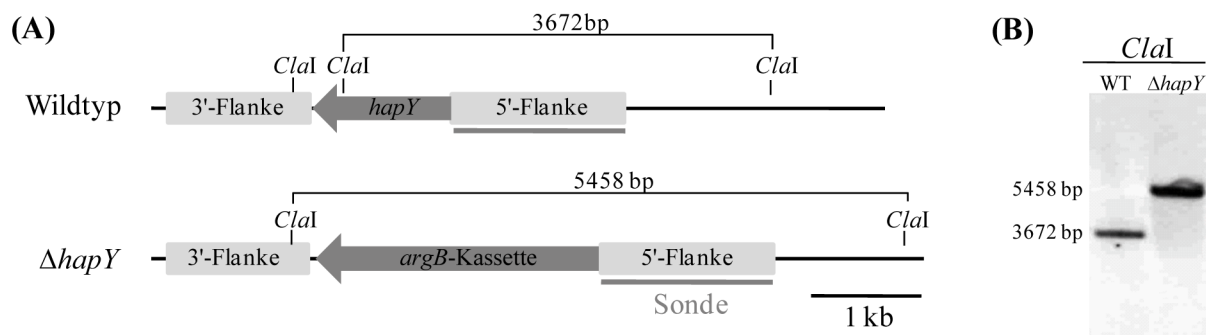


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Deletion von *hapY* in *A. nidulans* A1153 (A) und die dazu gehörige Southern Blot-Analyse (B). (A) Die kodierende Sequenz von *hapY* wurde mit Hilfe der *argB*-Kassette deletiert. (B) Die Southern Blot-Analyse wurde mit *ClaI* verdauter genomischer DNA und der in der Abbildung (A) angedeuteten Sonde durchgeführt, welche mittels PCR und den Oligonukleotiden AN8826 up for/ AN8826 up rev (Tabelle 6) hergestellt wurde.

Auf allen getesteten Medien zeigte der erhaltene $\Delta hapY$ -Stamm keine phänotypischen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 13). Als Stickstoffquelle wurde sowohl Glutamin als auch Nitrat getestet. Der sexuelle und asexuelle Lebenszyklus der Mutante $\Delta hapY$ entspricht denen des Wildtyps. Ebenso gab es keinerlei Auffälligkeiten in Flüssigkultivierungen, die dem Phänotyp des $\Delta hapC$ -Stammes ähneln (Daten nicht gezeigt). Im Moment gibt es keinerlei Hinweise darauf, welche Rolle dieses Gen für den Pilz spielt.

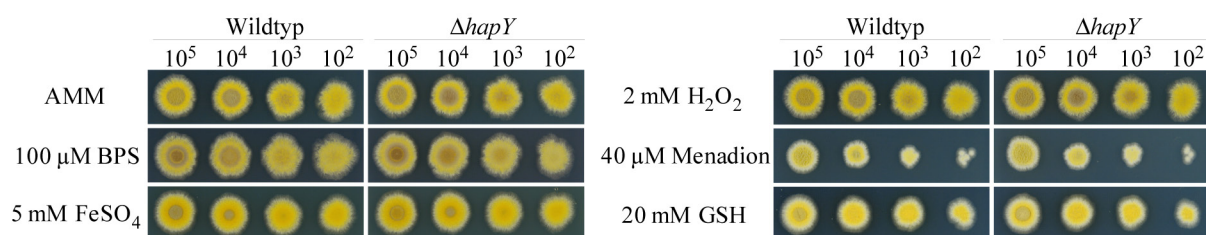


Abbildung 13: Phänotyp von $\Delta hapY$. Je 10^5 - 10^2 Konidien des Wildtyps (A1153 ArgB+) sowie der Deletionsmutante ($\Delta hapY$) wurden auf AMM und AMM mit 100 μ M BPS/ 5 mM $FeSO_4$ / 2 mM H_2O_2 / 40 μ M Menadion/ 20 mM GSH aufgetropft und bei 37 °C inkubiert.

1.5 Komplementation der $\Delta hapY$ Mutante und Lokalisationsstudien

Die Komplementation der *hapY*-Deletionsmutante erfolgte mit einer C-terminalen Venus-Fusion des Proteins HapY. Diese Fusion diente gleichzeitig für Studien zur zellulären Lokalisation des Proteins unbekannter Funktion.

Mittels der Primerpaare AN8826 up *NotI* for/ AN8826 *SpeI* rev und AN8826 down *KpnI* for/ AN8826 down *KpnI* rev und genomischer DNA als Matrize wurden das Gen *hapY* mit Promotor-Region und die 3'-Flanke des Gens amplifiziert und über die Schnittstellen *NotI/SpeI* und *KpnI* in den Vektor plinkerVenus-ptrA gebracht. Zur Selektion der Transformanten wurde die Pyridoxin-Auxotrophie des Stammes genutzt. Dafür wurde die

(A)

pHapYVenus-pyroA

$\Delta hapY$

$hapY^{Venus}$

(B)

The figure is divided into two panels, (A) and (B). Panel (A) shows the schematic of the pHapYVenus-pyroA construct and its integration into the hapY locus. The construct is a linear DNA fragment with a 3'-Flanke region, a pyroA-Kassette, a Venus gene, a linker, a hapY gene, and a 5'-Flanke region. The total length of the construct is 3781 bp. The integration site is flanked by BamHI sites. The integration is performed via homologous recombination, resulting in the replacement of the pyroA-Kassette with the argB-Kassette. The resulting hapY locus contains the pyroA gene, the Venus gene, and the hapY gene. The total length of the hapY locus is 5965 bp. The integration is confirmed by PCR genotyping, showing bands at 4163 bp and 5965 bp. Panel (B) shows a gel electrophoresis image of the PCR products. The lanes are labeled WT, $\Delta hapY$, and $hapY^{Venus}$. The WT lane shows a band at 4748 bp. The $\Delta hapY$ lane shows no band. The $hapY^{Venus}$ lane shows bands at 5965 bp and 4163 bp.

Die Komplementationsmutante *hapY^{Yenus}* zeigt den gleichen Phänotyp wie der Wildtyp und die Deletionsmutante. Mittels mikroskopischer Analysen konnte das bisher uncharakterisierte Protein HapY eindeutig im Kern lokalisiert werden (Abbildung 15).

Die Komplementationsmutante *hapY^{Yenus}* zeigt den gleichen Phänotyp wie der Wildtyp und die Deletionsmutante. Mittels mikroskopischer Analysen konnte das bisher uncharakterisierte Protein HapY eindeutig im Kern lokalisiert werden (Abbildung 15).

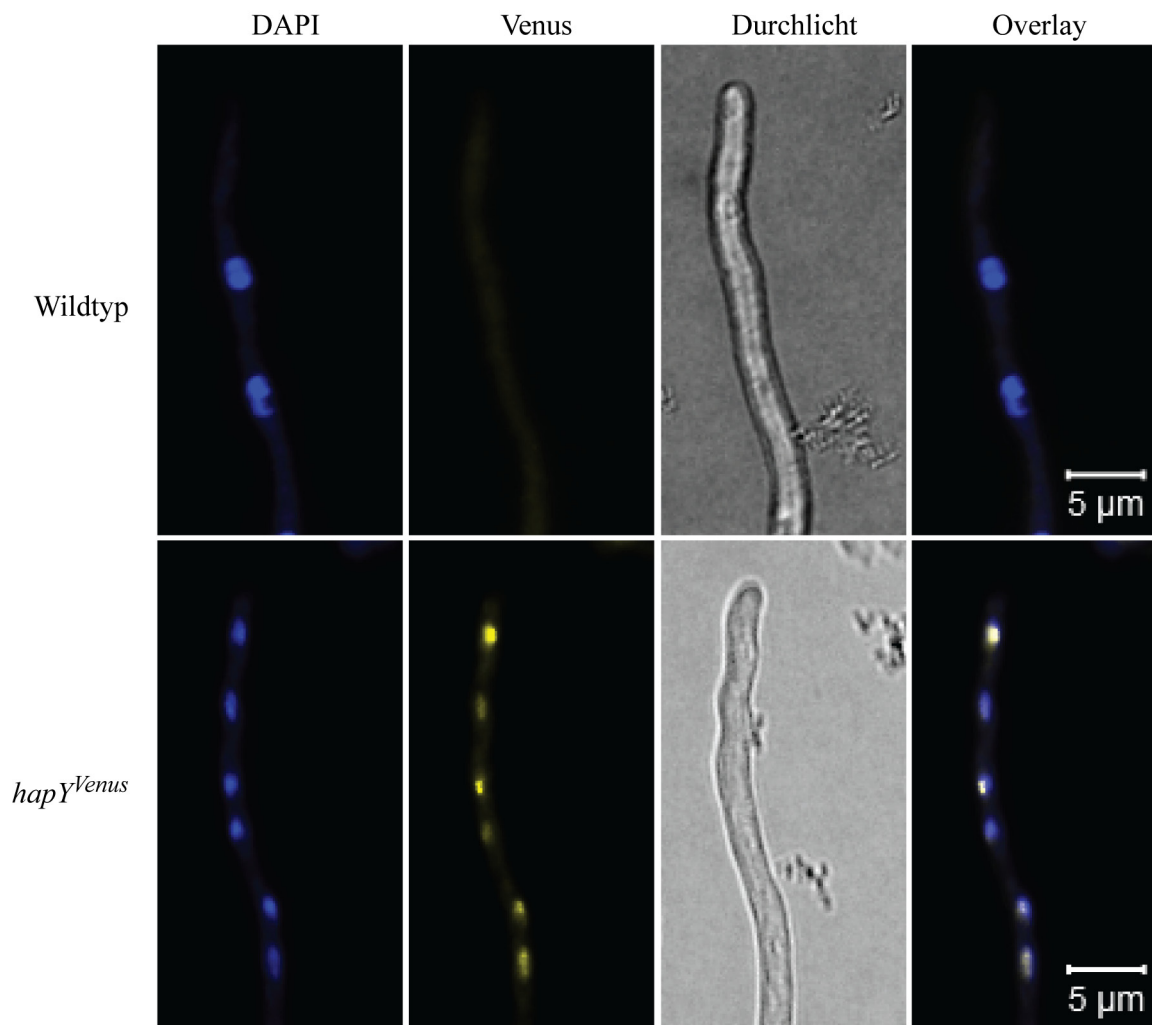


Abbildung 15: Lokalisation von HapY^{Venus}. Mikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung 63-fach) des Wildtyps (A1153 ArgB⁺) und der *hapY^{Venus}*-Komplementation. Die Stämme wurden 14 h auf Deckgläschen in 24-well Platten mit 300 µl AMM kultiviert und anschließend wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt. Es ist jeweils in der ersten Spalte die DAPI-Färbung, in der zweiten Spalte die Venus-Fluoreszenz, in der dritten Spalte eine Durchlicht-Aufnahme und in der letzten Spalte ein Overlay aus DAPI-Färbung und Venus-Fluoreszenz dargestellt.

1.6 Visualisierung der Interaktion zwischen HapC und HapY in *A. nidulans*

In vivo Protein-Protein-Interaktionsstudien zwischen HapC und HapY erfolgten durch Bimolekulare Fluoreszenz Komplementations-Analysen (Kodama & Hu, 2012; Shyu *et al*, 2006). Diese Methode beruht auf einer strukturellen Komplementation zweier nicht fluoreszierender N- und C-terminaler Fragmente eines fluoreszierenden Proteins, in diesem Fall Venus.

Hierfür wurde Venus in dem Plasmid phapCVenus-ptrA gegen linkerVenusC und in dem Plasmid pAN8826Venus-pyroA gegen linkerVenusN ausgetauscht. Das Fragment linkerVenusC wurde mittels der Primer *SpeI* linkerVenusC for/ *XmaI* Venus rev amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *SpeI/XmaI* in den Vektor phapCVenus-ptrA kloniert. linkerVenusN wurde mit Hilfe des Primerpaares *SpeI* linkerVenus for/ *XmaI* VenusN rev

amplifiziert und ebenfalls über die Schnittstellen *SpeI/XmaI* in den Vektor pHapYVenus-pyroA kloniert. Die entstandenen Plasmide wurden phapCVenusC-ptrA und pHapYVenusN-pyroA genannt. Der Vektor phapCVenusC-ptrA wurde mit *EcoRV* linearisiert und zur Komplementation der *hapC* Deletion in *A. nidulans* $\Delta hapC$ (A1153) transformiert. Nachdem die Transformanten (*hapC*^{VenusC}) durch eine Southern Blot-Analyse bestätigt wurden (Abbildung 16A), konnte der *hapC*^{VenusC}-Stamm mit dem zirkulären Plasmid pHapYVenusN-pyroA transformiert werden. Die einfach ektopische Integration der DNA wurde mittels Southern Blot (Abbildung 16B) und PCR (Abbildung 16C) bestätigt. Der entstandene Stamm wurde *hapC*^{VenusC}/*hapY*^{VenusN} genannt.

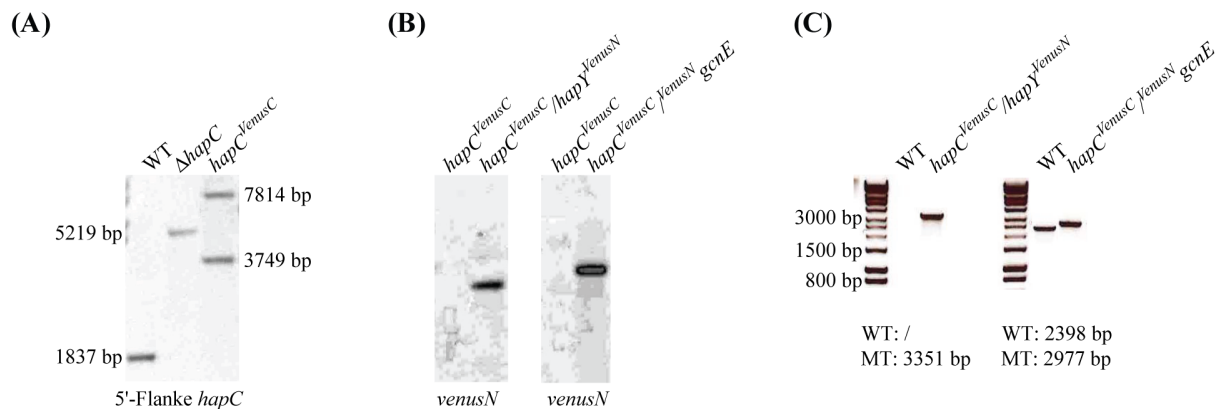


Abbildung 16: Mutanten für die Bimolekulare Fluoreszenz Komplementationsanalyse. (A) Southern Blot-Analyse der *hapC*-Deletion im Wildtyp A1153 und anschließende Komplementation mit phapCVenusC-ptrA. Die genomische DNA wurde mit *PstI* verdaut. Die Hybridisierung erfolgte mit der 5'-Flanke von *hapC*, die mittels PCR und dem Primerpaar hapC down for/ hapC down rev (Tabelle 6) hergestellt wurde. (B) Southern Blot-Analyse der ektopischen Integration von pHapYVenusN-pyroA und pVenusNGenE-pyroA in den *hapC*^{VenusC}-Stamm. Die genomische DNA wurde mit *SpeI* verdaut. Als Sonde diente das DNA-Fragment *venusN*, welches mittels PCR und den Oligonukleotiden *SpeI* linkerVenus for/ *XmaI* VenusN rev hergestellt wurde. (C) PCR-Analyse der ektopischen Integration von pHapYVenusN-pyroA (AN8826 up *NotI* for/*XmaI* VenusN rev) und pVenusNGenE-pyroA (AN3621*XmaI* rev/AN3621up+*gcnENotI* for) in das Genom des Stammes *hapC*^{VenusC}.

Zur Visualisierung der Interaktion zwischen HapC und HapY wurden beide Stämme, *hapC*^{VenusC} als Kontrolle und *hapC*^{VenusC}/*hapY*^{VenusN}, in 300 μ l AMM Glutamin, 14 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Proben mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert. Mittels der mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 17 und des erhaltenen Fluoreszenzsignals für den Stamm *hapC*^{VenusC}/*hapY*^{VenusN} konnte eine Protein-Protein-Interaktion zwischen HapC und HapY *in vivo* nachgewiesen werden.

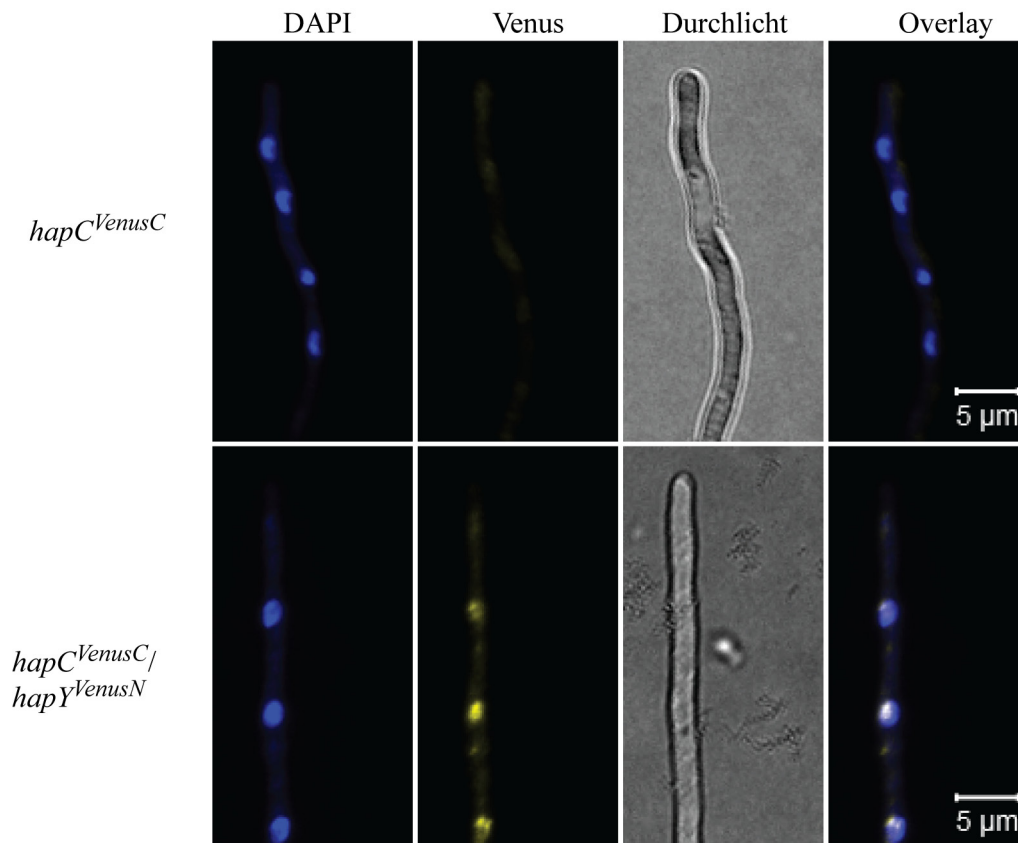


Abbildung 17: *In vivo* Protein-Protein-Interaktion mittels Bimolekularer Fluoreszenz Komplementations-Analyse. Mikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung 63-fach) des *hapC^{VenusC}* (Kontrolle) und des *hapC^{VenusC} / AN8826^{VenusN}*-Stammes. Die Stämme wurden 14 h auf Deckgläschen in 24-well Platten mit 300 μ l AMM kultiviert, fixiert und anschließend mit DAPI gefärbt. Es ist jeweils in der ersten Spalte die DAPI-Färbung, in der zweiten Spalte die Venus-Fluoreszenz, in der dritten Spalte eine Durchlicht-Aufnahme und in der letzten Spalte ein Overlay aus DAPI-Färbung und Venus-Fluoreszenz dargestellt.

1.7 Heterologe Expression des *A. nidulans* *hapY* in *E. coli* und Proteinreinigung

Zur Durchführung von kinetischen Protein-Interaktionsstudien in Echtzeit zwischen HapY und dem CBC wurde das Protein rekombinant in *E. coli* hergestellt. Wichtig hierfür ist, dass eine monodisperse Proteinpräparation erhalten wird.

Für die rekombinante Herstellung von HapY in *E. coli* wurde zunächst die für das Protein kodierende DNA-Sequenz aus *A. nidulans* in einer für *E. coli* Codon-optimierten Variante synthetisiert (life technologies). Anschließend wurde das synthetische Gen mittels der Restriktionsschnittstellen *Bam*HI/*Hind*III in den Expressionsvektor pET28aH6TEV kloniert. *E. coli* BL21 (DE3) wurde mit dem resultierenden Plasmid pET28aH6TEVHapY transformiert und die nachfolgende Expression erfolgte in TB-Autoinduktionsmedium mit 5 μ g/ml Kanamycin für etwa 24 h bei 20 °C und 100 rpm in 2 l Schikanekolben.

Das rekombinante Protein 6xHis-HapY wurde über eine 5 ml His Trap FF-Säule mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 ml/min aufgereinigt. Die Reinigung wurde mittels SDS-PAGE

überprüft (Abbildung 18A), wobei auffällt, dass sich ein Großteil des Proteins im Durchlauf befand und damit nicht an das Ni-Chelatmedium gebunden hatte. Die Eluate A3 und A4 wurden vereinigt, auf ein Volumen von 2 ml eingengt und auf eine Superdex 200 PG 16/60 Gelfiltrationssäule geladen. Das gemessene Elutionsvolumen für das Protein 6xHis-AN8826 betrug 50,44 ml, was einer molekularen Masse von etwa 570 kDa entspricht (Abbildung 18B). Das theoretische Molekulargewicht beträgt jedoch nur 40,5 kDa. Das bedeutet, es handelt sich bei der gereinigten Proteinprobe um ein Multimer bestehend aus mehr als 10 6xHis-HapY Untereinheiten.

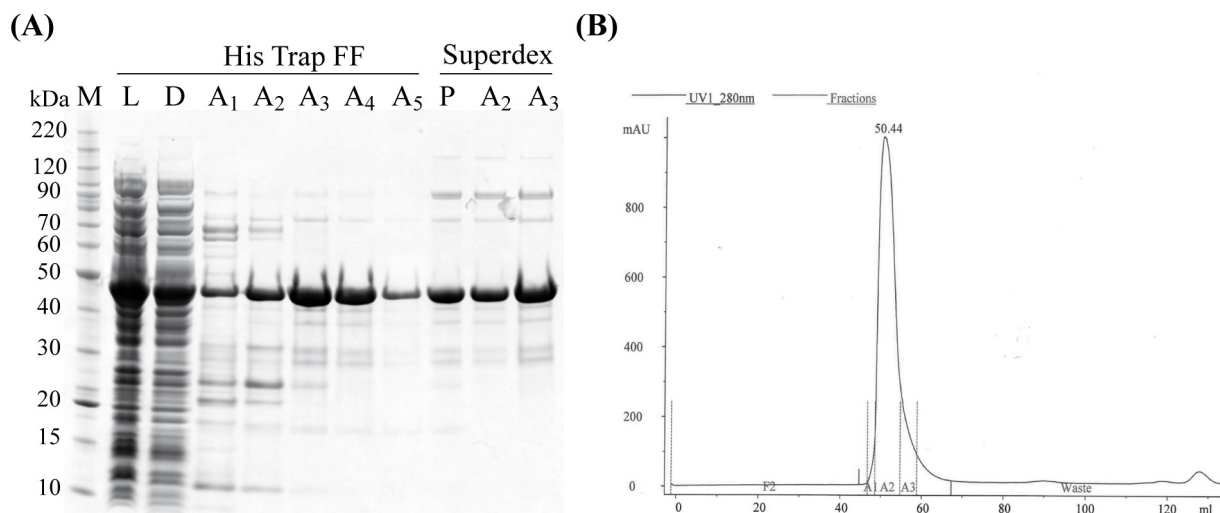


Abbildung 18: Aufreinigung des rekombinant hergestellten Proteins HapY. (A) Coomassie gefärbtes SDS-Page der Proben der Aufreinigung. Lysat (L), Durchlauf (D), Eluatfraktionen (A), A₃ + A₄ der His-Trap FF (P). **(B)** Chromatogramm der Superdex 200 PG 16/60 Gelfiltration.

Auffallend war, dass das Protein im Eluat der Gelfiltration bei Raumtemperatur präzipitierte, sich bei 4 °C jedoch wieder auflöste. Dies ist vermutlich auf die geringere Salzkonzentration im Puffer, im Vergleich zu dem der ersten Reinigung, zurückzuführen. Auf Grund der Polydispersität und der Löslichkeitseigenschaften der Proteinpräparation waren Protein-Interaktionsstudien mittels Oberflächen-Plasmonresonanz nicht durchführbar.

2 Regulation des CBCs

Aus der Literatur ist bekannt, dass der zu *A. nidulans* homologe CCAAT-Bindekomplex NF-Y in Säugetieren durch post-translationale Modifikationen, wie beispielsweise Acetylierungen (Currie, 1998; Li *et al*, 1998; Manni *et al*, 2008), Phosphorylierungen (Chae *et al*, 2004; Chan *et al*, 2010; Yun *et al*, 2003) und Ubiquitinierungen (Nardini *et al*, 2013) beeinflusst bzw. reguliert wird. Da in *A. nidulans* über solch eine post-translationale Modifikation der CBC-Untereinheiten bisher nichts bekannt ist, wurden insbesondere Untersuchungen zur

Acetylierung, aber auch zur Ubiquitinierung durchgeführt. Ein potentieller Kandidat für die Acetylierung von HapC ist die Histon-Acetyltransferase GcnE, welche hier genauer untersucht wurde.

2.1 Deletion von *gcnE* und Charakterisierung der Mutante

Die Deletion des Gens *gcnE* in *A. nidulans* erfolgte mit Hilfe der Drei-Fragment-PCR. Zur Herstellung des Deletionskonstruktes dienten die Primerpaare *gcnE* up for/ *gcnE* up rev und *gcnE* down for/ *gcnE* down rev und die *argB*-Kassette. Nach Transformation des Wildtyp-Stammes RMSO11 mit dem Konstrukt integrierte dieses homolog ins Genom. Transformanten, die Arginin-prototroph waren, wurden mittels Southern Blot-Analyse überprüft (Abbildung 20A) und charakterisiert.

Bei der phänotypischen Charakterisierung der Δ *gcnE*-Mutante wurden viele Ähnlichkeiten zur Δ hapC-Mutante festgestellt. Beide Mutanten zeigen ein verlangsamtes Wachstum sowohl in Flüssigkultur als auch auf festen Medium (Daten nicht gezeigt). Sie besitzen einen starken Defekt in ihrem asexuellen Vermehrungszyklus und sind nicht mehr in der Lage, sich sexuell fortzupflanzen. Außerdem zeigt die Δ *gcnE*-Mutante ein schlechtes Wachstum auf Acetamid als einziger N- und C-Quelle, was ein charakteristischer Phänotyp der Δ hapC-Mutante ist. Ebenfalls gibt es Überlappungen zwischen der Δ *gcnE*- und der Δ hapC-Mutante bezüglich der Sensitivität gegenüber bestimmten Substanzen, wie z. B. Menadion und CoCl_2 (Abbildung 19). Der hier beschriebene Phänotyp der *gcnE*-Deletionsmutante gleicht auffällig stark dem Phänotyp der Δ hapC-Mutante. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass es möglicherweise eine Verbindung zwischen der Histon-Acetyltransferase GcnE und dem CBC gibt.

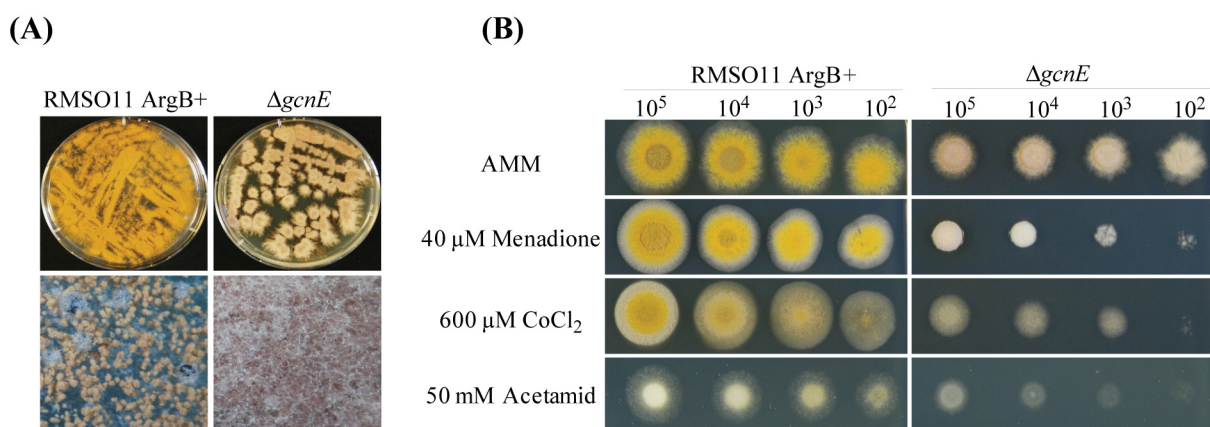


Abbildung 19: Phänotypische Charakterisierung der Δ gcnE-Mutante. (A) Aufsicht und mikroskopische Aufsicht auf Agarplatten, bewachsen mit den Stämmen RMSO11 ArgB+ und Δ gcnE. (B) Je 10^5 - 10^2 Konidien des Wildtyps (RMSO11 ArgB+) sowie der Deletionsmutante (Δ gcnE) wurden auf AMM, AMM mit 40 μ M

Menadion/ 600 μ M CoCl₂ /50 mM Acetamid als einzige N-und C-Quelle aufgetropft und bei 37 °C für 2-3 Tage inkubiert.

2.2 Komplementation der $\Delta gcnE$ -Mutante und Lokalisationsstudien

Die $\Delta gcnE$ -Mutante wurde mit einer Venus-Fusion komplementiert, um anschließende Lokalisationsstudien zu GcnE durchzuführen. Da GcnE sowohl N-terminal als auch C-terminal essentielle Protein-Domänen besitzt, wurden sowohl N- als auch C-terminale Venus-Fusionen hergestellt, um auszuschließen, dass die Funktion des Proteins beeinträchtigt wurde. Die entsprechenden Komplementationskonstrukte pVenusgcnE-ptrA und pgcnEVenus-ptrA wurden mit Hilfe der in Abbildung 6 dargestellten Plasmide hergestellt. Die Plasmide wurden mit *Bmg*BI linearisiert und die $\Delta gcnE$ -Mutante damit transformiert. Die Transformanten wurden auf Pyrithiamin-Agarplatten selektiert und die Integration der DNA am *gcnE*-Gen-Lokus mittels Southern Blot-Analyse nachgewiesen (Abbildung 20A). Die Stämme wurden als ^{Venus}*gcnE* und *gcnE*^{Venus} bezeichnet. Sowohl die N-terminale als auch die C-terminale Venus-Fusion haben den Wildtyp-Phänotyp wieder hergestellt.

Für die Lokalisationsstudien wurden beide Stämme 14 h bei 37 °C in AMM Glutamin angezogen. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen zeigten sowohl für die N- als auch für die C-terminale GcnE Venus-Fusion eine eindeutige Lokalisation im Kern (Abbildung 20B). Demnach ist eine Interaktion mit dem ebenfalls im Kern lokalisierten CBC nicht ausgeschlossen.

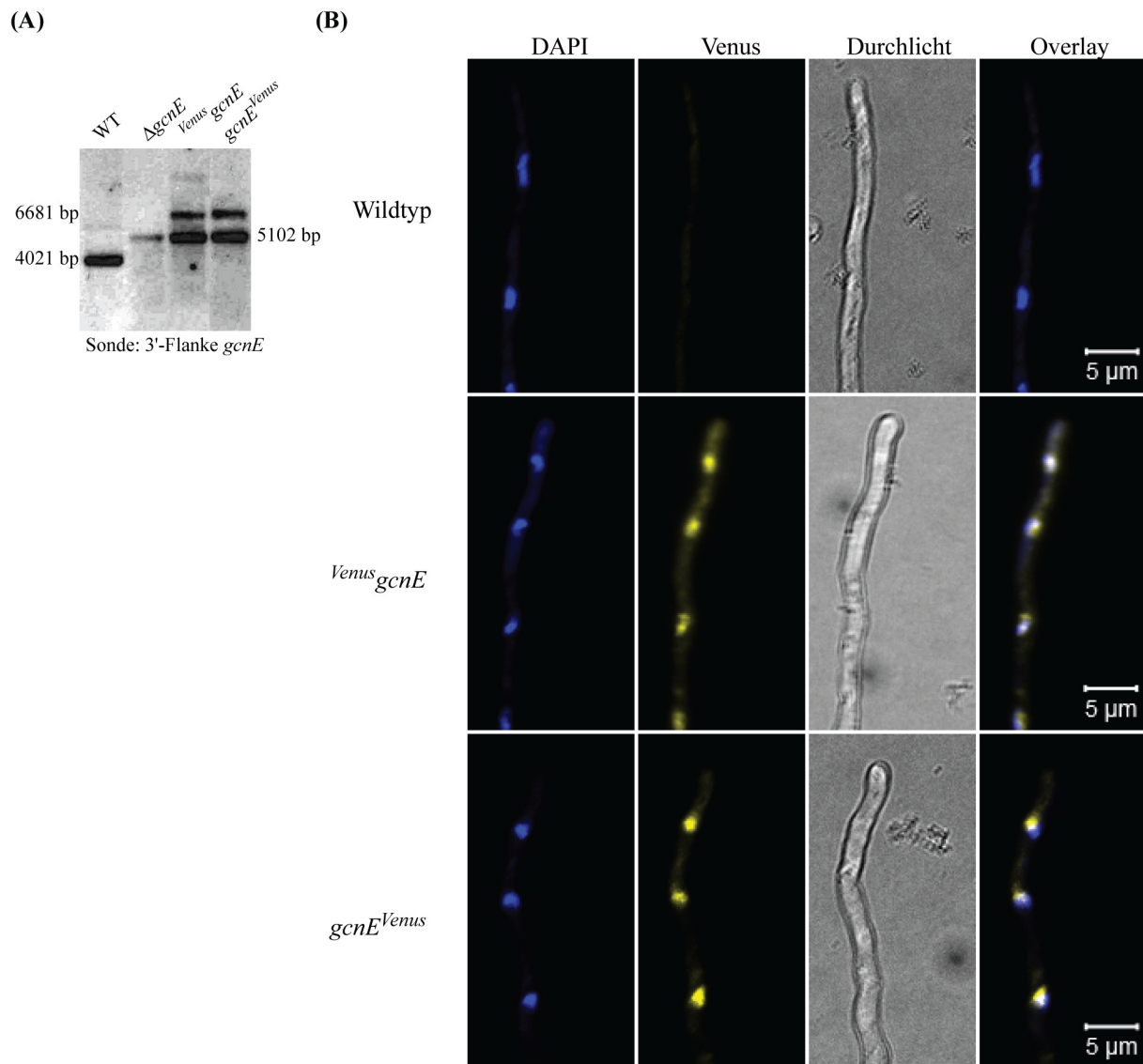


Abbildung 20: Southern Blot-Analyse der *gcnE*-Mutanten und Lokalisation von GcnE. (A) Die genomische DNA für die Southern Blot-Analyse wurde mit PstI verdaut. Die Hybridisierung erfolgte mit der 3'-Flanke von *gcnE*. (B) Mikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung 63-fach) des Wildtyps (RMSO11 ArgB⁺), der $Venus\ gcnE$ und der $gcnE^{Venus}$ Komplementation. Die Stämme wurden 14 h auf Deckgläschen in 24-well Platten mit 300 μ l AMM und 10^5 Sporen/ml kultiviert, anschließend fixiert und es wurde eine DAPI-Färbung der Zellkerne durchgeführt. Es ist jeweils in der ersten Spalte die DAPI-Färbung, in der zweiten Spalte die Venus-Fluoreszenz, in der dritten Spalte eine Durchlicht-Aufnahme und in der letzten Spalte ein Overlay aus DAPI-Färbung und Venus-Fluoreszenz dargestellt.

2.3 *In vivo* Interaktionsstudien zwischen HapC und GcnE in *A. nidulans*

Da sowohl GcnE als auch HapC vorrangig im Zellkern lokalisiert sind, besteht prinzipiell die Möglichkeit einer Protein-Protein-Interaktion. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden Bimolekulare Fluoreszenz Komplementationsanalysen durchgeführt.

Dafür wurde der *A. nidulans* Stamm $hapC^{VenusC}$ mit dem Plasmid pVenusNgcnE-pyroA transformiert. Die Pyridoxin-prototrophen Transformanten wurden mittels PCR (Abbildung

16C) und Southern Blot-Analyse (Abbildung 16B) überprüft und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Vier Transformanten wurden in 24-well Platten auf Deckgläschen mit 300 µl AMM pro *well* und 10⁵ Sporen/ml für 14 h bei 37 °C angezogen. Das Myzel wurde fixiert und die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Bei allen vier Transformanten konnte kein gelbes Fluoreszenzsignal detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Das heißt es gibt entweder keinen direkten Kontakt zwischen GcnE und HapC oder die Venus-Fragmente kommen in der Anordnung nicht in Kontakt. Für eine klare Aussage müssten weitere Konstrukte erstellt und getestet werden. Zum Beispiel GcnE mit C-terminalem VenusN-Tag.

2.4 Heterologe Expression des *A. nidulans* *gcnE* in *E. coli* und Proteinreinigung

Parallel zu den *in vivo* Protein-Protein-Interaktionsstudien zwischen GcnE und HapC sollten *in vitro* Interaktionsstudien zwischen GcnE und dem CBC durchgeführt werden, unter Verwendung heterolog produzierter und gereinigter Proteine.

Für diesen Zweck wurde das Gen *gcnE* mittels PCR, dem Primerpaar AN*gcnEBam*HI_f/AN*gcnEHind*III_r und *A. nidulans* cDNA als Matrize amplifiziert und über die eingebauten Schnittstellen *Bam*HI/ *Hind*III in den Vektor pMalC2HTEV kloniert. Die DNA-Sequenz des Gens wurde durch eine Sequenzierung bestätigt (Daten nicht gezeigt). *E. coli* BL21 (DE3) wurde mit dem erhaltenen Plasmid pMalC2HTEVGcnE transformiert. Die Produktion des Fusionsproteins MBP(His)-GcnE erfolgte in TB-Autoinduktionsmedium mit 100 µg/ml Ampicillin für etwa 24 h bei 30 °C und 100 rpm in 2 l Schikanekolben.

Die Reinigung des rekombinanten Proteins MBP(His)-GcnE erfolgte über eine 50 ml Dextrin Sepharose Säule mit einer Fließgeschwindigkeit von 10 ml/min. Das mit 10 mM Maltose eluierte Protein in E1 und E2 wurde vereint und anschließend mit TEV-Protease gespalten, um das MBP(His) vom GcnE zu trennen. Es folgte ein weiterer Reinigungsschritt über eine 25 ml Nickel Sepharose 6FF Säule zur Trennung des abgespaltenen MBP(His) vom GcnE. Die Reinigung wurde mittels SDS-PAGE dokumentiert (Abbildung 21).

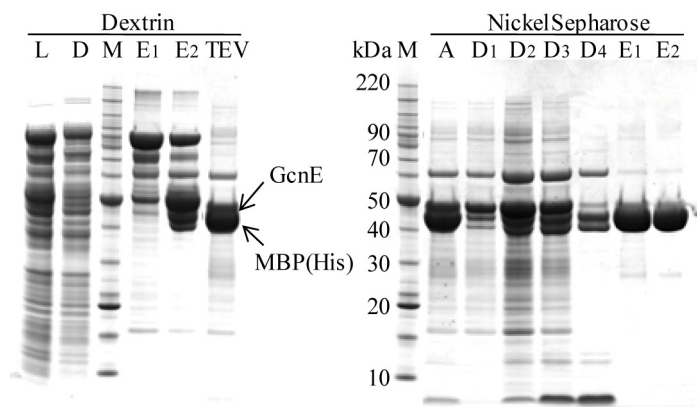


Abbildung 21: Aufreinigung des rekombinanten Proteins GcnE. Coomassie gefärbte SDS-Gele mit den Proben beider Aufreinigungen. Lysat (L), Durchlauf (D), Eluat (E), Eluat nach TEV-Spaltung (TEV), Auftrag (A).

Anhand des SDS-Gels der Dextrin-Reinigung wird ersichtlich, dass das Fusionsprotein mit einer molekularen Masse von 91,1 kDa nicht vollständig an dem Säulenmaterial gebunden hatte. Außerdem scheint es, als wäre das Protein schon während der Produktion prozessiert worden. Die Abspaltung und Abtrennung des MBP(His) über die Nickel-Sepharose-Säule war erfolgreich, jedoch wurde die Prozessierung des GcnE hier noch deutlicher. Im Durchlauf (D2-D3) erschienen neben einer Hauptproteinbande bei etwa 47 kDa weitere Proteine mit geringerer molekularer Masse.

Um ausschließlich das Volllänge-Protein zu isolieren, wurde ein Konstrukt mit C-terminalen 6xHis-Tag erstellt. Hierfür wurde mittels PCR, *A. nidulans* cDNA mit dem Primerpaar ANgcnENdeI/ ANgcnEBamHIr *gcne* amplifiziert und das entstandene DNA-Fragment über die Schnittstellen *NdeI/BamHI* in den Vektor pET28aS2TTH kloniert. Mit dem entstandenen Plasmid pET28aGcnETH6 wurde sowohl *E. coli* BL21 (DE3) als auch *E. coli* Rosetta (DE3) transformiert. Es wurden Expressionsversuche mit beiden Stämmen bei Kultivierungstemperaturen zwischen 15 °C und 30 °C durchgeführt. In allen Fällen war das Protein unlöslich. Somit konnte keine Reinigung des Proteins unter nativen Bedingungen durchgeführt werden. Doch auch die Reinigung von GcnE-6xHis unter stark denaturierenden Bedingungen war erfolglos. Das Protein befand sich stets im Durchlauf und hat nicht am Säulenmaterial gebunden (Daten nicht gezeigt).

Ein weiterer Versuch, GcnE zu produzieren und zu reinigen, erfolgte mit dem Plasmid pET28aMalTGcnETH6. Darin befindet sich am N-Terminus von GcnE das Maltose Bindeprotein zur Verbesserung der Löslichkeit und am C-Terminus ein 6xHis-Tag über den das Protein gereinigt werden soll. Die Transformation und Expression dieses Plasmids in *E. coli* BL21 (DE3) resultierte in einem löslichen MBP-GcnE-6xHis-Fusionsprotein, jedoch war auch hier der His-Tag nicht für die Bindung an einem Ni-Chelatmedium zugänglich. Da keine geeignete Reinigungsstrategie für GcnE entwickelt werden konnte, wurden keine *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien zwischen GcnE und dem CBC durchgeführt.

in aktiven Promotor-Regionen nachgewiesen werden. Ob post-translationale Modifikationen an diesem konservierten Lysinrest in *A. nidulans* eine Rolle spielen, wurde mit Hilfe der Mutante *hapCK129R^{Venus}* untersucht. Die Herstellung der Mutante erfolgte analog zur Komplementation von $\Delta hapC$. Die Mutation im *hapC*-Gen wurde mit Hilfe der Primer AN4034 K129R for/AN4034 K129R rev eingefügt und mittels Sequenzierung bestätigt. Nach Transformation des mit *Sna*BI linearisierten Plasmids pHapC(K129R)Venus-ptrA wurden die Transformanten durch Southern Blot-Analyse überprüft (Daten nicht gezeigt) und charakterisiert (Abbildung 23). Außerdem wurden durch BLAST-Analysen potentielle Kandidaten ermittelt, die für die Ubiquitinierung von H2B in *A. nidulans* verantwortlich sein könnten. In *S. cerevisiae* erfolgt die Ubiquitinierung von H2B durch die Enzyme Rad6 (E2) und Bre1 (E3) (Worthylake *et al*, 1998). Die BLAST-Analyse identifizierte zwei Orthologe zu Rad6 in *A. nidulans*, die durch die Gene AN2761 und AN8258 kodiert werden und ein Ortholog zu Bre1, welches durch AN6574 kodiert wird. Zur Untersuchung, ob Ubiquitinierungen generell eine Rolle für H2B in *A. nidulans* spielen, sollten diese Gene deletiert werden. Zur Herstellung der Deletionskonstrukte wurde die Drei-Fragment-PCR verwendet. Als Flanken dienten je 1000 bp Up- und Downstream der Gene. Als Selektionsmarker wurde die *argB*-Kassette verwendet. Nach Transformation der Deletionskonstrukte wurden die Transformanten mittels Southern Blot-Analyse überprüft (Daten nicht gezeigt). Nach mehrfachen Versuchen konnte nur eine Deletion von AN8258 erzeugt werden, welche zusammen mit der Mutante *hapCK129R^{Venus}* charakterisiert wurde (Abbildung 23).

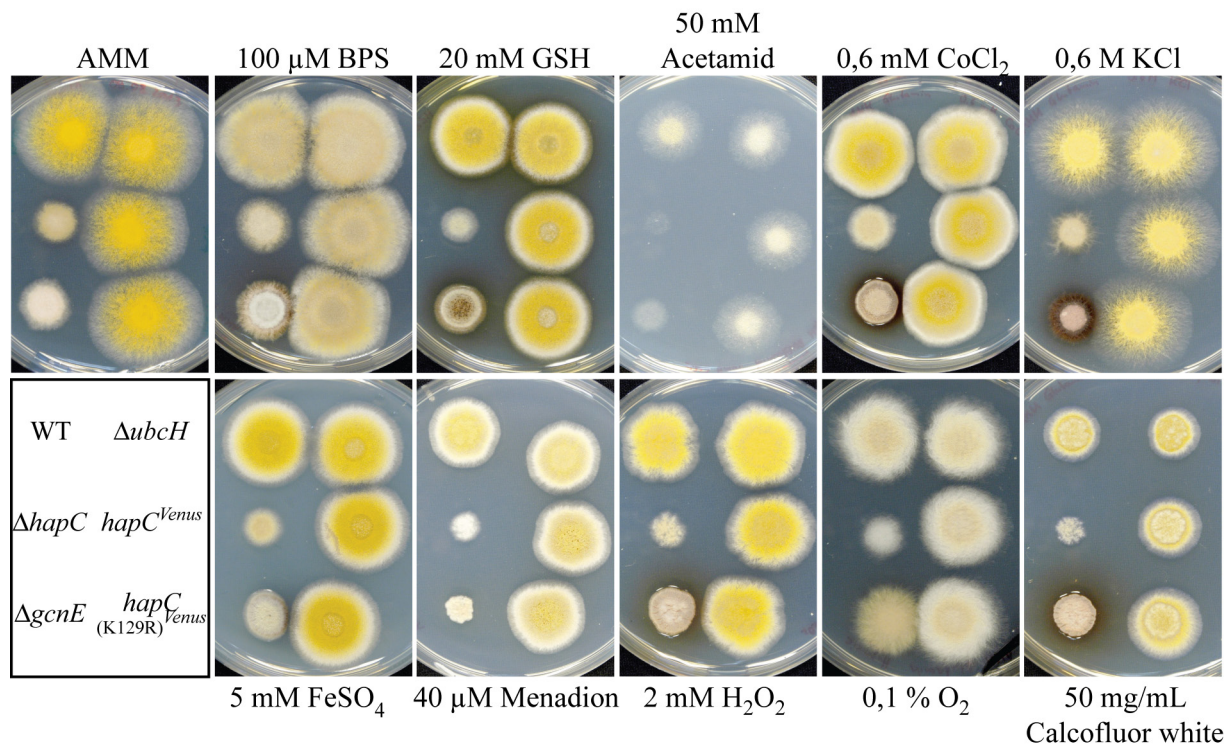


Abbildung 23: Phänotypische Charakterisierung der Deletionsmutante *ubcH* (AN8258) und der *hapCK129R^{Venus}*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp (WT), zu $\Delta hapC$, $\Delta gcnE$ und der *hapC^{Venus}*-Mutante.

Sowohl die Mutante *hapCK129R^{Venus}* als auch die Deletionsmutante $\Delta ubcH$ zeigten keine phänotypischen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp auf den getesteten Medien. Ebenfalls konnte kein Wachstumsdefekt oder ein Defekt im sexuellen oder asexuellen Vermehrungszyklus des Pilzes festgestellt werden. Demzufolge handelt es sich bei der E2 Ubiquitin Konjugase AN8258 um kein essentielles Enzym für *A. nidulans* und eine mögliche post-translationale Modifikation von H2B scheint keinen Einfluss auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors CBC zu haben.

Des Weiteren wurden Western Blot-Analysen hinsichtlich Acetylierungen und Ubiquitinierungen mit den unter 1.3 beschriebenen Kernextrakten und koimmunopräzipitierten Proteinen durchgeführt. Die Präzipitate setzten sich aus den 3 Untereinheiten des CBCs, einem uncharakterisierten Protein und Histonen zusammen. Für diese Proben konnte weder eine Acetylierung noch eine Ubiquitinierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Auch die LC-MS/MS-Analysen zeigten keine HapC-Peptide mit post-translationaler Modifikation (Jeram *et al*, 2009; Zee & Garcia, 2013). Demnach scheinen post-translationale Modifikationen, wie die Acetylierung und Ubiquitinierung, für den CBC in *A. nidulans* keine

Rolle zu spielen. Für eine eindeutige Aussage müssten jedoch weitere Experimente durchgeführt werden.

3 Proteomanalyse zur Identifizierung von CBC-regulierten Proteinen

Die Gene der aktuellen Genom-Annotation von *Aspergillus nidulans* kodieren für 10.740 Proteine. Ca. 2 % dieser Proteine besitzen einen isoelektrischen Punkt < 3 und > 11 . 6,5 % der Proteine haben eine molekulare Masse < 8 kDa und > 120 kDa. Diese Proteine befinden sich außerhalb des darstellbaren pH- bzw. Molekulargewicht-Bereichs eines 2D-Gels. Darüber hinaus stellt auch die Hydropathie der Proteine eine Limitierung für die Methode dar. Hydrophobe Proteine besitzen einen GRAVY-Wert (*Grand Average of Hydropathy*) ≥ 0 (Kyte & Doolittle, 1982). Etwa 4,5 % der Proteine von *A. nidulans* besitzen einen GRAVY $> 0,4$. Diese können mit der hier angewandten 2D-Gelelektrophorese-Methode nicht aufgetrennt werden. Schlussendlich verbleiben 87 % der Proteine, genauer etwa 9390, die theoretisch mit dieser Methode darstellbar sind. Jedoch wird eine gewisse Anzahl der Proteine vom gesamten Proteom lediglich unter bestimmten Wachstumsbedingungen oder in sehr geringer Häufigkeit synthetisiert, was eine geringere Anzahl der tatsächlich auf dem 2D-Gel aufgelösten Proteine zur Folge hat.

3.1 Erstellung einer detaillierten Proteomkarte von *A. nidulans*

Die Proteomkarte sollte einen Überblick über das darstellbare Proteom von *A. nidulans* schaffen. Hierfür wurde der *A. nidulans* Wildtyp-Stamm TN02A7 in AMM, mit Glutamin als einziger Stickstoffquelle, angezogen, bis die Hälfte der Glukose verbraucht war. Das Myzel wurde anschließend geerntet und die Proteine wurden extrahiert. Von dem Gesamtproteinextrakt wurden 300 µg *A. nidulans*-Protein mittels nicht linearen IPG-Streifen 3 - 11 (24 cm) und 12,5 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die resultierenden 2D-Gele wurden mit Kolloidal-Coomassie-Blau gefärbt. Zur Erstellung der Proteomkarte von *A. nidulans* wurden die Proteinspots massenspektrometrisch identifiziert und mit dem Computerprogramm Decodon Delta2D-4.2 annotiert. Die ca. 1400 detektierten Proteinspots geben nur einen kleinen Überblick über das *A. nidulans*-Proteom. Um die Zusammensetzung der in verschiedene Proteinspots aufgetrennten Proteine bzw. Proteinspezies von *A. nidulans* zu untersuchen, wurden diese aus den gefärbten 2D-Gelen ausgeschnitten, einer tryptischen Proteolyse unterzogen und mittels MALDI-TOF-MS-Analyse identifiziert. Die erstellte 2D-Proteomkarte (Abbildung 24) umfasst eine Anzahl von 415 identifizierten Proteinspots. Davon konnten insgesamt 326 verschiedene Proteine identifiziert werden, was nur etwa 3,5 %

der theoretisch darstellbaren Proteine ausmacht. Alle identifizierten Proteine mit der auf der 2D-Proteomkarte zugewiesenen Nummer, der Lokusnummer, dem Proteinnamen, dem theoretischen Molekulargewicht und isoelektrischen Punkt und den zugehörigen MS und MS/MS-Daten sind in Tabelle 9 dargestellt. Bestimmte Proteine erscheinen als mehrere Proteinspots und stellen vermutlich verschiedene Proteinspezies, sogenannte Isoformen eines Proteins dar. Lediglich 256 der 326 identifizierten Proteine wurden nur in einem einzigen Proteinspot gefunden.

Das identifizierte Protein mit der niedrigsten berechneten molekularen Masse stellt das hypothetische Protein mit der Lokusnummer AN0177 mit 8,8 kDa dar, das mit der höchsten berechneten molekularen Masse ist die putative Oxoglutarat-Dehydrogenase mit 117,9 kDa. Dies bestätigt die Auftrennung im erwarteten MW – Bereich des verwendeten SDS-PAGE-Systems. Hinsichtlich des isoelektrischen Punktes wurden Proteine im theoretischen pH-Bereich zwischen 3,5 und 13 gefunden. Die Limitierung des Systems bezüglich der Darstellung hydrophober Proteine wurde durch das Ergebnis verdeutlicht, dass keine Proteine mit einem GRAVY-Score $\geq 0,36$ detektiert wurden (Daten nicht gezeigt).

Entsprechend der „Gene Ontology“-Klassifizierung (<http://www.aspergillusgenome.org/cgi-bin/GO/goTermMapper>) können die identifizierten Proteine der 2D-Proteomkarte hinsichtlich Lokalisierung und biologischem Prozess in Kategorien eingeordnet werden. Den meisten Proteinen wird eine zytoplasmatische Lokalisation zugeordnet. Die nächst größeren Gruppen umfassen Proteine aus dem Zellkern und dem Mitochondrium. Aus der Membranfraktion hingegen wurden keine Proteine gefunden. Kategorisiert man die Proteine nach Beteiligung an biologischen Prozessen ist der Hauptteil in der Stressantwort und an der Regulation biologischer Prozesse involviert.

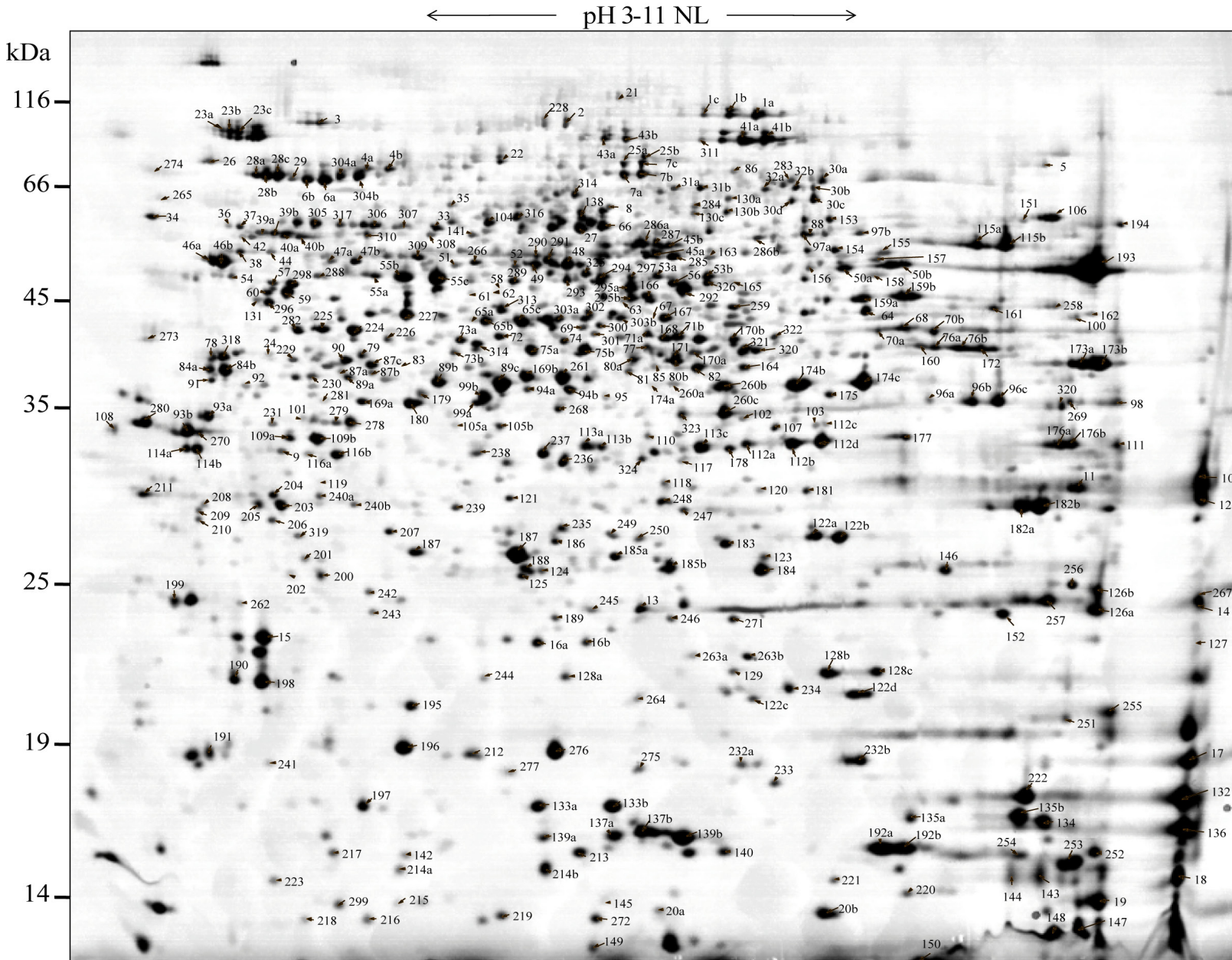


Abbildung 24: Myzeliale Proteomekarte von *A. nidulans* kultiviert in AMM mit Glutamin als einziger Stickstoffquelle. Die Proteine wurden in einem pH-Gradienten von 3-11 (nicht linear) getrennt und die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt. Die markierten Spots stellen identifizierte Proteine dar und die Nummern beziehen sich auf **Tabelle 9.**

3.2 Vergleichende Proteomanalysen von *A. nidulans* Wildtyp mit der $\Delta hapC$ -Mutante

Der Vergleich des myzelialen Proteoms von *A. nidulans* Wildtyp und der $\Delta hapC$ -Mutante sollte Aufschluss darüber geben, welche Proteine in Abhängigkeit vom CBC differentiell produziert werden.

Zum Erhalt der zu untersuchenden Proteinextrakte wurden *A. nidulans* Wildtyp TN02A7 und der $\Delta hapC$ -Stamm Nat24 in AMM mit Glutamin als einziger Stickstoffquelle kultiviert. Nach Verbrauch der halben Glukose-Menge wurde das Myzel geerntet und die Proteine wurden extrahiert. Für beide Stämme wurden je drei biologische Replikate angefertigt. Zum Vergleich der Proteinextrakte unterschiedlicher Stämme in einem Gel wurden die Proteine mit Hilfe des Refraction-2D Kits (NH DyeAGNOSTICS, Halle) behandelt. 50 µg Protein vom Extrakt des Wildtyps bzw. der Mutante wurden mit G-Dye100 bzw. G-Dye200 markiert. Je 25 µg Protein von Wildtyp und Mutante wurden mit G-Dye300 markiert und als interner Standard verwendet. Anschließend wurden die Proteine durch 2D-SDS-PAGE getrennt und die G-Dye Markierung mittels Fluoreszenzbildgebung detektiert. Die Daten-Analyse und -Auswertung erfolgte mit Hilfe der Delta2D-4.2 Software. In Abbildung 25 ist exemplarisch eine Fusion zweier Gele dargestellt.

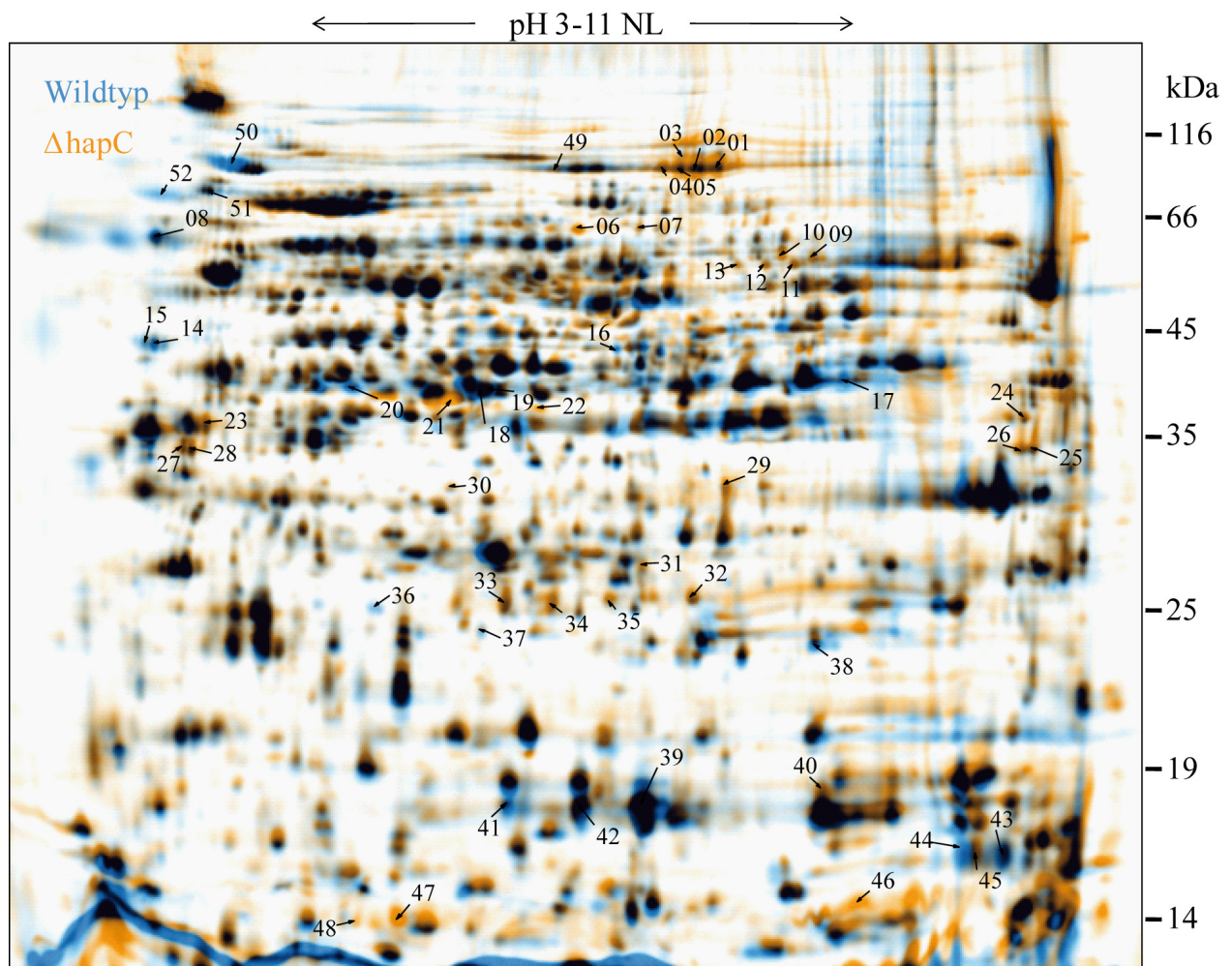


Abbildung 25: 2D-Gel (pH 3-11 NL) von *A. nidulans* Wildtyp TN02A7 versus $\Delta hapC$ -Mutante Nat24. Dargestellt ist eine Software-generierte Fusion (Delta2D-4.2) zweier Gele in Falschfarben. Die blauen Proteinpunkte repräsentieren das vorherrschende Proteinmuster im Wildtyp, die orangenen in der *hapC*-Mutante. Schwarze Proteinspots sind in beiden Stämmen gleichermaßen vorhanden.

Insgesamt konnten 64 Proteinspots mit einer signifikanten Volumenänderung (zweifache Standardabweichung) detektiert werden. Mittels MALDI-TOF-MS-Analyse wurden 52 Proteinspots identifiziert, die einer Anzahl von 34 verschiedenen Proteinen entsprechen. Von den 52 identifizierten Proteinen zeigten 31 Proteinspots des $\Delta hapC$ -Proteoms eine höhere Abundanz im Vergleich zum Wildtyp, die anderen 21 eine geringere. Mittels „Gene Ontology“-Analyse erfolgte eine Kategorisierung der Proteine. Tabelle 8 gibt einen Überblick über differenziell regulierte Proteine im $\Delta hapC$ -Stamm.

Tabelle 8: ^{a)}Proteinnummer in Abbildung 25, ^{b)}Regulation: +/- bezieht sich auf die durchschnittliche Volumenänderung der Proteinpunkte im *hapC*-Proteom verglichen zum Wildtyp (statistische Analyse der Refraction-2D-Gele mit der Delta2D-4.2 Software).

Protein-Nr. ^{a)}	Lokus-Nr.	Funktion/ Proteinname	Regulation ^{b)}
Wachstum und Entwicklung			
33	AN0163	Rho-GDP Dissoziationsinhibitor (Gdi)	2,49
34	AN0163	Rho-GDP Dissoziationsinhibitor (Gdi)	2,12
28	AN4501	Putatives 14-3-3 Protein, ArtA	4,19
27	AN4501	Putatives 14-3-3 Protein, ArtA	2,58
13	AN6688	Septin AspB	2,26
11	AN6688	Septin AspB	2,19
12	AN6688	Septin AspB	2,12
21	AN8009	Thiamin Biosynthese Protein	2,74
20	AN8009	Thiamin Biosynthese Protein	-2,25
50	AN9339	Katalase B, CatB	-6,48
Aminosäuremetabolismus			
15	AN2903	Pepsinogen	-2,94
14	AN2903	Pepsinogen	-2,98
3	AN4443	Cobalamin-unabhängige Methionin-Synthase	2,30
5	AN4443	Cobalamin-unabhängige Methionin-Synthase	2,28
2	AN4443	Cobalamin-unabhängige Methionin-Synthase	2,20
4	AN4443	Cobalamin-unabhängige Methionin-Synthase	2,19
1	AN4443	Cobalamin-unabhängige Methionin-Synthase	2,10
30	AN6726	Proteasom Untereinheit alpha Typ 2	2,39
Kohlenhydratmetabolismus			
42	AN5907	Ribose 5-phosphat-Isomerase	-2,71
39	AN5907	Ribose 5-phosphat-Isomerase	-2,98
41	AN5907	Ribose 5-phosphat-Isomerase	-3,70
16	AN6525	NAD-abhängige Format-Dehydrogenase AciA/Fdh	-2,28
17	AN8041	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	-2,03
52	AN8953	alpha-Glucosidase B	-5,88
10	AN9148	UDP-Glucose Pyrophosphorylase	2,22
9	AN9148	UDP-Glucose Pyrophosphorylase	2,14
Purin- und Pyrimidinmetabolismus			
31	AN10753	Phosphoribosylglycinamid-Formyltransferase	2,33
29	AN5884	Orotat-Phosphoribosyltransferase	2,21
Vitamin- und Kofaktorbiosynthese			
18	AN3928	Thiazol Biosynthese Enzym	-2,16
19	AN3928	Thiazol Biosynthese Enzym	-2,41
22	AN7725	Pyridoxin Biosynthese Protein	2,40
Elektronentransport und Respiration			
45	AN4388	Ubiquinol-Cytochrome c Reduktase-Komplex Protein	-2,82
44	AN4388	Ubiquinol-Cytochrome c Reduktase-Komplex Protein	-2,94
49	AN5525	Akonitase	-2,07

43	AN6246	Cytochrom c	-2,33
37	AN6631	ATP Synthase Untereinheit D	-4,42
38	AN6631	ATP Synthase Untereinheit D	-4,82
48	AN8118	Cytochrom c-Oxidase Polypeptid VI	3,02
Transport			
32	AN3147	Glycolipid Transfer Protein HET-C2	3,55
26	AN4087	40S ribosomales Protein S3	2,22
Translation			
24	AN10765	Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 3	2,28
Sekundärmetabolismus			
47	AN7894	Konserviertes hypothetisches Protein	3,71
Unfolded-Protein Response (UPR)			
8	AN7436	Disulfid-Isomerase	-2,62
40	AN8605	Cyclophilin A	2,07
51	AN2062	Glucose-reguliertes Protein	-2,28
Andere Proteine			
36	AN0804	tRNA ^{His} Guanylyltransferase Thg1, putative	-9,63
35	AN12404	Uncharakterisiertes Protein	2,18
7	AN1429	Cholin-Oxidase	3,02
6	AN1429	Cholin-Oxidase	2,99
46	AN2989	Glycin-reiches RNA-Bindeprotein	2,25
25	AN4087	40S ribosomales Protein S3	2,09
23	AN5744	14-3-3 family Protein	2,07

Die Deletion des Gens *hapC* führte in *A. nidulans* zu einer verminderten Synthese von Proteinen, die eine Rolle in der Redoxregulation, Respiration und dem Elektronentransport spielen. Proteine, die an Wachstum und Entwicklung, Transport, Translation und dem Purin- und Pyrimidinmetabolismus des Pilzes beteiligt sind, wurden in *deΔ hapC*-Mutante in vermehrten Mengen synthetisiert. Ebenfalls eine höhere Abundanz zeigte das Protein mit der Lokus-Nummer AN7894, dessen Gen Teil eines Sekundärmetabolitgenclusters ist. Dieses als *dba* bezeichnete Gencluster enthält ein Gen, welches für eine Polyketidsynthase kodiert und ist für die Biosynthese von 2,4-Dihydroxy-3-Methyl-6-(2-Oxopropyl)-Benzaldehyd (DHMBA) essentiell. Aus der Literatur ist bekannt, dass es sich um ein stilles Gencluster handelt. Die Aktivierung des Clusters gelang durch eine Kokultivierung von *A. nidulans* mit *Streptomyces rapamycinicus* (Schroeckh *et al*, 2009) oder durch die Deletion des *csnE* Gens, bedingt durch einen Defekt im Proteinabbau (Gerke *et al*, 2012).

3.3 Einfluss des CBCs auf das DHMBA Sekundärmetabolitgencluster

Verschiedene Arbeiten belegen, dass der CBC an der Regulation von Sekundärmetabolitgenclustern beteiligt ist, wie z. B. dem Penicillin-Biosynthesegencluster

(Litzka *et al*, 1996; Litzka *et al*, 1999; Spröte *et al*, 2008; Then Bergh *et al*, 1996). Die Proteomanalysen lassen darauf schließen, dass der CBC möglicherweise weitere Sekundärmetabolitgencluster reguliert. In Abbildung 26 ist das bereits erwähnte *dba*-Cluster mit dem benachbarten *ors*-Cluster und einem unbekannten Gencluster dargestellt. Die grauen und schwarzen Markierungen in Abbildung 26 kennzeichnen Gene, die durch die Koinkubation mit *S. rapamycinicus* aktiviert werden (Schroeckh *et al*, 2009).

Zur Bestätigung der höheren Abundanz des durch AN7894 kodierten Proteins in der *hapC*-Mutante und zur Überprüfung einer Koregulation von weiteren Genen des Clusters wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt.

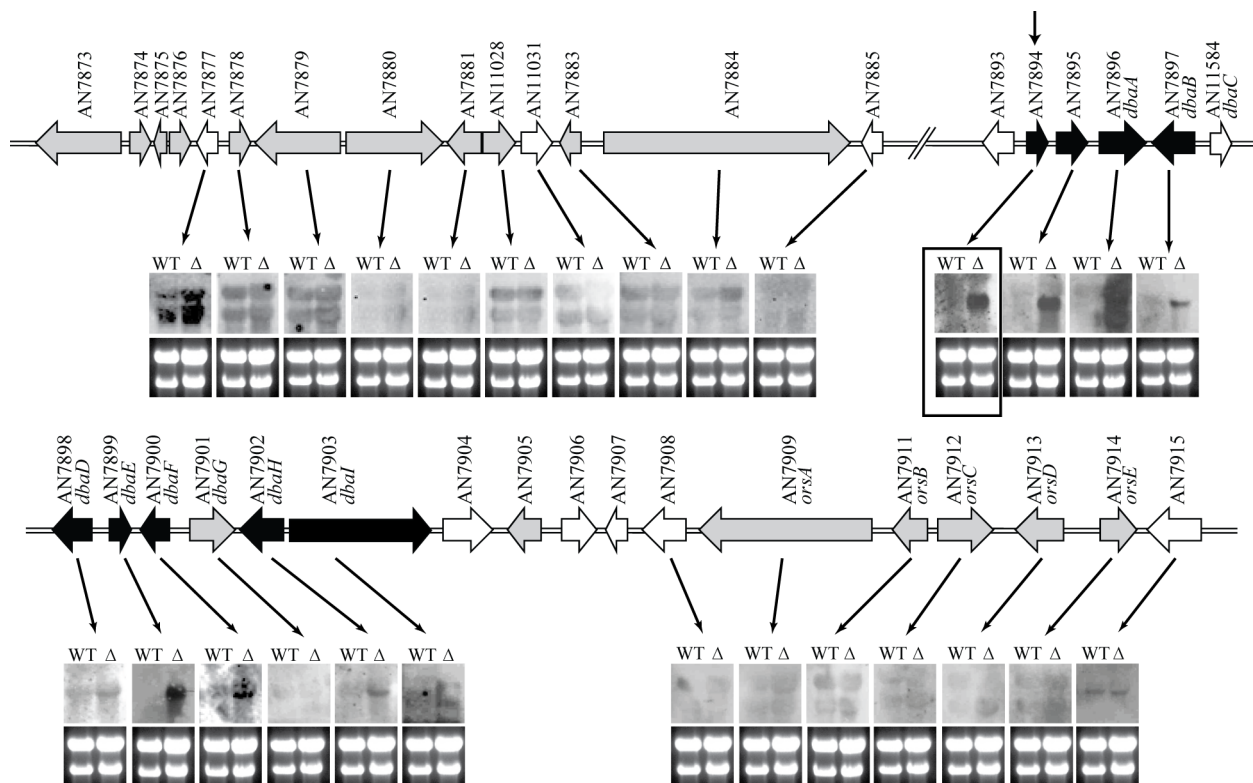


Abbildung 26: Northern Blot-Analyse der durch Kokultivierung von *A. nidulans* mit *S. rapamycinicus* induzierten Gene (grau und schwarz markierte Pfeile) vergleichend in *A. nidulans* Wildtyp (WT) und $\Delta hapC$ -Mutante (Δ). Es wurden 5 μ g Gesamt-RNA aufgetragen. Als Ladekontrolle ist unterhalb des Northern Blots das Agarosegel dargestellt, welches die 18S und 28S rRNA zeigt. Die Nummern über den Pfeilen kennzeichnen die annotierten ORF's.

Abbildung 26 zeigt, dass nur das *dba*-Gencluster und die Gene AN7894 und AN7895 (schwarze Markierung) durch den CBC beeinflusst wurden. Die Promotorsequenzen des im Cluster lokalisierten Transkriptionsfaktors (AN7901) und der Einzelgene weisen mehrere CCAAT-Boxen auf, was eine Regulation durch den CBC prinzipiell möglich macht.

Zur Analyse, ob das Produkt DHMBA des Sekundärmetabolitgenclusters *dba* von der $\Delta hapC$ -Mutante gebildet wird, wurden die Mutante $\Delta hapC$ und der Wildtyp sowohl in AMM als auch

in Vollmedium mit Glutamin als einziger Stickstoff-Quelle kultiviert bis die Hälfte der Glukose verbraucht war. Für den Wildtyp ergaben sich dadurch rund 24 h Kultivierungsdauer und für die Mutante 33 h. Die Kulturüberstände wurden mit Ethylacetat ausgeschüttelt und mittels HPLC analysiert.

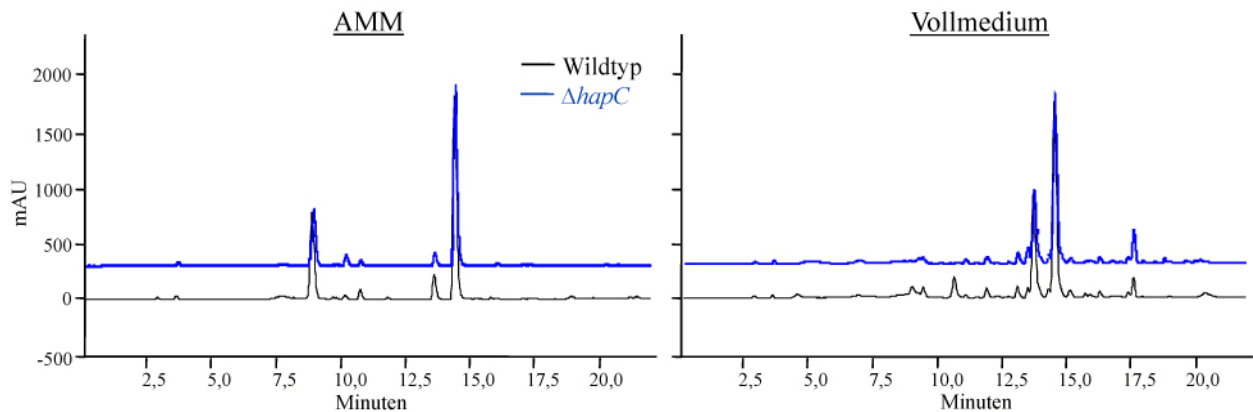


Abbildung 27: HPLC Profil der Kulturüberstände von *A. nidulans* Wildtyp (schwarz) und $\Delta hapC$ -Mutante (blau). Links, die Profile der AMM Kulturen; rechts, die der Vollmedium Kulturen. Aufgetragen ist die UV Absorption über der Retentionszeit.

Die in Abbildung 27 dargestellten Elutionsprofile der HPLC Analysen zeigten keine Unterschiede zwischen den Kulturüberständen von Wildtyp und Mutante. Entweder wird kein Produkt gebildet oder die Menge an DHMBA befindet sich unterhalb der Nachweisgrenze.

DISKUSSION

Das CCAAT-Box Promotor-Element und der daran bindende Transkriptionsfaktor NF-Y befanden sich unter den ersten identifizierten *cis*-Elementen und *trans*-wirkenden Faktoren. Dessen Zusammenspiel ist wichtig für die transkriptionelle Aktivierung zahlreicher eukaryotischer Gene. NF-Y bzw. dessen homolog CBC in *A. nidulans* besteht aus drei evolutiv konservierten Untereinheiten: dem H2B-ähnlichen HapC (NF-YB), dem H2A-ähnlichen HapE (NF-YC) und HapB (NF-YA) (Steidl *et al*, 1999). Alle drei Untereinheiten sind essentielle Bestandteile des Komplexes. Eine Deletion der Gene *hapB*, *hapC* und *hapE* führt zu drastischen Wachstumsdefekten des filamentösen Pilzes *A. nidulans* (Steidl *et al*, 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine weitere Charakterisierung des CBCs in dem Modellorganismus *A. nidulans* vorgenommen. Diese Ergebnisse tragen zu einem besseren Verständnis der von diesem Komplex vermittelten regulatorischen Mechanismen bei. Da die Funktion des CBCs beispielsweise in *A. fumigatus* wichtig für die Virulenz des Pilzes ist, können die Erkenntnisse hilfreich für ein besseres Verständnis von Infektionen durch Pilze sein.

1 Interaktion vom CBC mit Proteinen unbekannter Funktion

Der heterotrimere Protein-Komplex CBC aus *A. nidulans* besitzt eine theoretische molekulare Masse von ca. 94 kDa. Die Reinigung und anschließende Gelfiltrationsexperimente des nativen CBC aus *A. nidulans* ergaben eine molekulare Masse von ungefähr 120-130 kDa für den Protein-Komplex (Kato *et al*, 1997; Litzka *et al*, 1998). Als eine mögliche Ursachen für diese Differenz von 30-40 kDa kommt die Assoziation von weiteren Proteinen mit dem CBC in Betracht. In EMSA-Studien mit dem CBC aus Kernextrakten wurden zwei spezifische DNA-Protein-Komplexe beobachtet, die ebenfalls auf weitere Interaktionspartner des CBCs hindeuten (Steidl *et al*, 1999). Um potentiell neue Interaktionspartner des CBCs zu identifizieren, wurde eine Koimmunopräzipitation mit dem CBC aus Kernextrakten von *A. nidulans* durchgeführt. Dabei wurde ein Protein unbekannter Funktion mit der Lokusnummer AN8826 gefunden. Dieses besitzt eine molekulare Masse von 37,5 kDa und würde damit als mögliche fehlende Unbekannte bezüglich der Gelfiltrationsexperimente in Frage kommen. Das Protein wurde als HapY bezeichnet. BLAST-Analysen ergaben, dass es sich um ein für Ascomyceten spezifisches Protein handelt. Außer einer AT-hook-Domäne und einem Kernlokalisierungssignal besitzt es keine weiteren funktionalen Proteinstrukturen. AT-

hook-Domänen wurden erstmals für HMGA-Proteine beschrieben (Reeves & Nissen, 1990) und kommen vorwiegend in eukaryotischen Kernproteinen in einfacher oder mehrfacher Anzahl vor. AT-*hook*-Domänen sind spezifisch für chromosomale bzw. DNA-bindende Proteine. Es wird vermutet, dass diese als bewegliche Halterung in der kleinen Furche der DNA dienen (Aravind & Landsman, 1998; Fonfria-Subiros *et al*, 2012). Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass der zum CBC homologe humane NF-Y-Komplex mit HMG-I(Y) (HMGA) interagiert. Die Interaktion basiert auf der DNA-bindenden Domäne (DBD) von NF-YA, dem Homolog von HapB und der AT-*hook*-Domäne von HMGA (Currie, 1997). Weitere Studien zeigten jedoch, dass es sich nicht um eine Protein-Protein-Interaktion handelt, sondern um eine Promotor begründete Wechselwirkung zwischen HMGA und NF-Y, die von den flankierenden Regionen des Pentanukleotids CCAAT abhängt (Liberati *et al*, 1998b). Beim HapY handelt es sich nicht um ein HMGA-Protein, da diese in der Regel 3 unabhängige AT-*hook*-Domänen besitzen (Reeves, 2000). Dennoch konnte mittels Bimolekularer Fluoreszenz Komplementations-Analyse eine eindeutige *in vivo* Interaktion zwischen dem CBC und HapY im Kern nachgewiesen werden. Die Deletion des *hapY*-Gens zeigte unter den bisher getesteten Bedingungen keine phänotypischen Veränderungen zum Wildtyp. Schlussfolgernd scheint das Gen für den Pilz unter Standard-Laborbedingungen keine essentielle Bedeutung zu haben. Auf der Suche nach der vierten Untereinheit des Hap-Komplexes aus *S. cerevisiae* in *A. nidulans* entdeckten Tanaka und Kollegen (2002) HapX, dessen Funktion zum damaligen Zeitpunkt nicht geklärt werden konnte. Der Phänotyp der *hapX*-Deletionsmutante zeigte, ähnlich wie die *hapY*-Deletionsmutante, keine Veränderungen zum Wildtyp. Erst Jahre später konnte HapX als Eisenregulator identifiziert werden (Hortschansky *et al*, 2007). Möglicherweise ist HapY nur unter bestimmten Bedingungen relevant für den Pilz. Andererseits könnte die Interaktion des CBCs mit dem HMGA-ähnlichen Protein auch eine Promotor-spezifische Wechselwirkung sein, wie sie im Menschen beobachtet wurde (Liberati *et al*, 1998b). Vermutlich dient das Protein einer Erhöhung der CBC-Affinität an bestimmte Promotor-Regionen. Zur Analyse, welche Promotor-Regionen bzw. Gene durch HapY beeinflusst werden, könnten Transkriptom-Analysen oder Promotorstudien durchgeführt werden. Die Aufreinigung des rekombinanten HapY Proteins führte bisher zu keinem monodispersen Proteinpräparat. *In vitro* Protein-Protein- bzw. Protein-DNA-Interaktionsstudien konnten daher nicht durchgeführt werden. Diverse Faktoren stellen eine mögliche Ursache für die komplizierte Reinigung des Proteins dar. Beispielsweise besitzt das Protein einen starken basischen isoelektrischen Punkt (pI 10,3), wodurch es zu ionischen Wechselwirkungen mit den sauren Proteinen von *E. coli* kommen kann. Des Weiteren besitzt die AT-*hook*-Domäne auch *in vitro* eine hohe Bindungsspezifität zu DNA.

Die Aminosäuresequenz des Proteins besteht zu einem hohen Anteil aus Prolin (16,4 %). Prolin ist aufgrund seiner zyklischen Form eine sehr ungewöhnliche Aminosäure und wird häufig als Helix- und β -Faltblatt Brecher bezeichnet (Williamson, 1994). Dies ist vermutlich der Grund dafür, dass für das HMGA-ähnliche Protein HapY keine Sekundärstruktur vorausgesagt werden kann. Zur genaueren Untersuchung wurde mit dem Programm PONDR (Predictor of natural disordered regions) (Romero *et al*, 2001) eine Vorhersage zur Bestimmung von intrinsisch ungeordneten Bereichen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die Vorhersage gibt für annähernd das gesamte Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit eine intrinsische Unordnung an. Das Genom eukaryotischer Zellen kodiert für eine hohe Anzahl intrinsisch ungeordneter Proteine. Besonders Transkriptionsfaktoren neigen zu intrinsischer Unordnung. Eine Analyse zeigte, dass AT-hook-Domänen und basische Regionen von Transkriptionsfaktoren eine hohe Unordnung aufweisen. Außerdem ist die intrinsische Unordnung der Aktivierungsdomänen von Transkriptionsfaktoren wesentlich höher als die der DNA-Bindungsdomänen. Eine hohe intrinsische Unordnung wurde z. B für die NF-Y-Untereinheit NF-YA vorausgesagt (Liu *et al*, 2006). Intrinsisch ungeordnete Proteine bzw. Regionen sind durch eine hohe Spezifität und eine geringe Affinität zu ihren Interaktionspartnern charakterisiert. Dies führt zu einer hohen Flexibilität der Proteine, die in der transkriptionellen Regulation von großer Bedeutung ist.

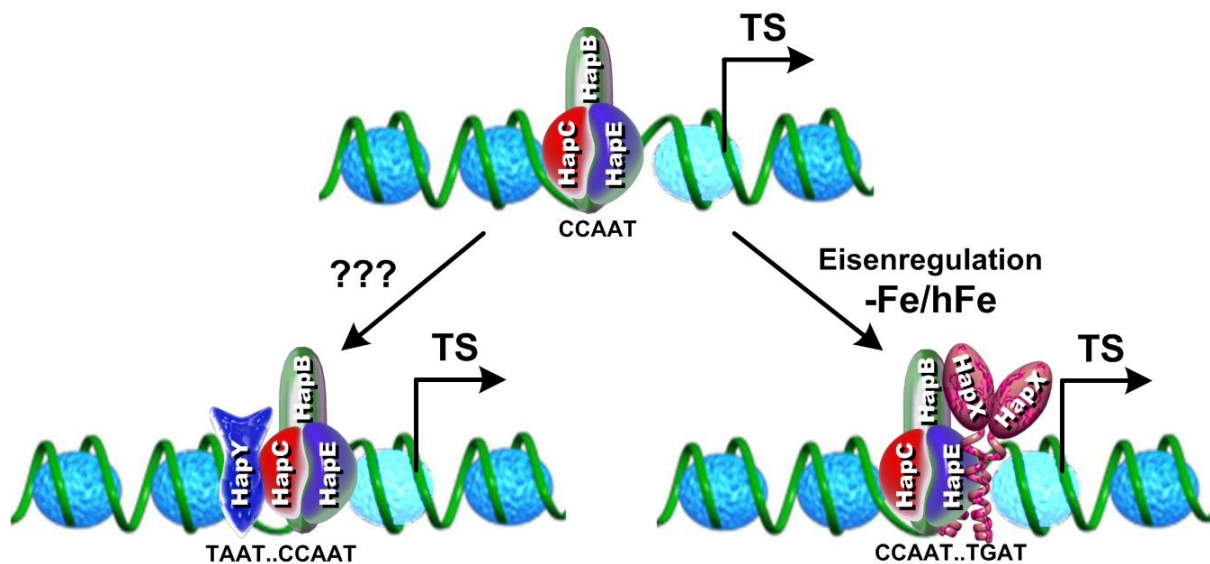


Abbildung 28: Modell möglicher Regulationsmechanismen des CBC. Der CBC bindet an CCAAT-Boxen und aktiviert bzw. reprimiert dadurch die Expression unterschiedlicher Gene. Die Bindung an Promotorbereiche bestimmter Gene erfordert das Zusammenspiel des CBCs mit weiteren Interaktionspartnern. Die Regulation Eisen-abhängiger Gene erfolgt durch die Interaktion des CBCs mit HapX. Der Einfluss von HapY auf CBC-regulierte Gene ist bisher nicht bekannt.

2 Rolle des CBCs bei der Nukleosomen Positionierung

In der Literatur gibt es eine Reihe von Hinweisen darauf, dass der CBC nicht nur an der transkriptionellen Regulation vieler Gene beteiligt ist sondern auch eine wichtige Rolle in der Promotor-Organisation und Nukleosomen-Positionierung spielt. Ausschlaggebend dafür sind die zwei Untereinheiten HapC und HapE des CBCs, die strukturell eng verwandt mit den Kernhistonen H2B und H2A sind. Frühere Studien zu dem homologen Komplex NF-Y vom Menschen zeigten, dass NF-Y mit dem Histon-Heterodimer H3/H4 assoziiert, jedoch nicht mit H2A/H2B (Caretti *et al*, 1999). Im Gegensatz dazu wurde der CBC im Rahmen dieser Arbeit mit allen 4 Kernhistonen H2A/H2B/H3 und H4 koimmunopräzipitiert. Aktuelle Strukturanalysen haben ergeben, dass der CBC nachdem er die CCAAT-Box gebunden hat, die DNA in einer Histon-ähnlichen Weise beugt (Huber *et al*, 2012; Nardini *et al*, 2013). Demnach besteht die Möglichkeit, dass der CBC die Heterodimere H2A/H2B verdrängt und somit die Nukleosomen-Bildung verhindert oder sie nur ersetzt und einen Komplex mit H3/H4 in der ersten Nukleosomenwindung bildet. Laut dem Model von Huber *et al* (2012) ist der Verbleib von H2A/H2B in der zweiten Nukleosomenwindung aufgrund der α N-Helix von HapB nicht möglich. Die hier generierten Daten zeigen jedoch, dass es eine Verbindung zu H2A/H2B geben muss. Möglicherweise liegt das CBC-gebundene Nukleosom in einer aufgeweiteten Form vor, so dass sich innerhalb der zwei DNA-Windungen ein H3/H4-Tetramer, ein H2A/H2B-Dimer und der CBC befinden. Interessanterweise wurde bei genomweiten Untersuchungen festgestellt, dass ein Großteil der Transkriptionsfaktor-Bindestellen in Nukleosomen freien Regionen liegen, um Transkriptionsfaktoren eine leichtere Zugänglichkeit zu gewähren (Jansen & Verstrepen, 2011). Insbesondere die CCAAT-Box ist eine der regulatorischen Sequenzen, die von Nukleosomen weitestgehend ausgespart wird (Segal *et al*, 2006). Die in dieser Arbeit durchgeführte Koimmunopräzipitation resultierte in einem heterogenen Gemisch zwischen Kernhistonen und CBC-Untereinheiten. Der deutlich höhere Anteil an CBC-Untereinheiten spricht dafür, dass der CBC in den meisten Fällen als Heterotrimer agiert und nur in bestimmten Fällen mit Histonen oder anderen Proteinen, wie z. B. dem HMGA-ähnlichen Protein HapY, interagiert (Abbildung 28). Des Weiteren scheint die Nukleosomen-Interaktion des CBC mit dem Histon H2A.X assoziiert zu sein. Es gibt in *A. nidulans* das kanonische H2A.X und die Histonvariante H2A.Z. Der Einbau der Histonvariante H2A.Z findet vorrangig in Promotor-Regionen statt und beeinflusst die Mobilität und Positionierung von Nukleosomen (Fan *et al*, 2002; Guillemette *et al*, 2005; Thakar *et al*, 2009). Es gibt heterotypische und homotypische H2A.Z-Nukleosomen. Heterotypische H2A.Z-Nukleosomen, die sowohl ein kanonisches H2A als auch ein H2A.Z

enthalten, sind besonders instabil, wurden aber in verschiedenen Organismen gefunden (Billon & Cote, 2013; Bönisch & Hake, 2012). Diese Aspekte vereint mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten führen zu der Hypothese, dass der CBC möglicherweise instabile heterotypische H2A.Z Nukleosomen erkennt und das Heterodimer H2A.Z/H2B verdrängt, um dessen Position einzunehmen. Das Ergebnis ist ein aufgeweitetes Nukleosom bestehend aus einem Tetramer H3/H4, einem Dimer H2A.X/H2B und den CBC-Untereinheiten.

3 Der CBC und post-translationale Modifikationen

Die Transkription wird durch die Verpackung der DNA in Chromatin stark inhibiert. Neben Chromatin-Remodulierungskomplexen, wie z. B. SWI/SNF, spielen post-translationale Modifikationen von Kernhistonen eine wichtige Rolle für die Zugänglichkeit von Transkriptionsfaktoren an die Ziel-DNA. In einer Reihe wissenschaftlicher Arbeiten wurde gezeigt, dass die Acetylierung der Lysinreste an den N-terminalen Enden von Kernhistonen durch Histonacetyltransferasen (HATs) zu einer Konformationsänderung der Nukleosomenstruktur führt und zu einer gesteigerten Affinität von Transkriptionsfaktoren an DNA beiträgt (Luger *et al*, 2012). Aus verschiedenen Arbeiten geht hervor, dass der NF-Y-Komplex mit HATs interagiert und die Bindung von NF-Y an die CCAAT-Box mit Histonacetylierungen korreliert (Currie, 1997; Gurtner *et al*, 2008; Jin & Scotto, 1998; Li *et al*, 1998). Dies führte zu der Hypothese, dass NF-Y und HATs für die zielgerichtete Chromatin-Remodulierung und eine damit verbundene aktive Transkription eng zusammenarbeiten. Da in *A. nidulans* über eine Interaktion zwischen CBC und HATs bisher nichts bekannt ist, wurden Untersuchungen dies bezüglich durchgeführt. Es erfolgte ein Screening mit der in dieser Abteilung vorhandenen *A. nidulans* HAT-Deletionsbank, bestehend aus 42 verschiedenen HAT-Mutanten (Nützmann *et al*, 2011), hinsichtlich phänotypischen Überlappungen mit den Hap-Mutanten (Daten nicht gezeigt). Die größte phänotypische Ähnlichkeit wies die *gcnE*-Deletionsmutante auf. Insbesondere der Wachstumsdefekt der $\Delta gcnE$ -Mutante auf Acetamid als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle ist sehr interessant, da dies ein charakteristischer Phänotyp der *hap*-Deletionsmutanten ist. Die HapC-Koimmunopräzipitate aus Zellkernextrakten von *A. nidulans* wiesen jedoch entgegen der Resultate von Currie (1998) keine assoziierten HAT-Enzyme auf. Daraus schlussfolgernd gibt es entweder keine direkte Interaktion zwischen dem CBC und HATs in *A. nidulans*, die Interaktion findet nicht im Zellkern statt oder die experimentellen Bedingungen erlauben keine Identifizierung einer Interaktion. Li *et al* (1998) fanden heraus, dass der NF-Y-Komplex selbst ein Target für Acetylierungen durch HATs ist, was für eine Interaktion auch außerhalb

des Zellkerns sprechen würde. Für die *A. nidulans*-Koimmunopräzipitate konnten allerdings mittels Westen Blot-Analysen und LC-MS/MS-Bestimmungen keine Acetylierungen an den CBC-Untereinheiten nachgewiesen werden. Demnach scheint der CBC im Gegensatz zum *Xenopus* NF-Y-Komplex kein Target für Acetylierungen zu sein. Zur weiteren Untersuchung hinsichtlich einer Interaktion zwischen dem CBC und GcnE, die für den menschlichen NF-Y-Komplex beschrieben wurde (Currie, 1998), sollten *in vitro* Interaktionsstudien durchgeführt werden. Für diesen Zweck wurde GcnE rekombinant in *E. coli* produziert und gereinigt. Im Gegensatz zum Hefe Gcn5 (Balasubramanian *et al*, 2002; Barrios *et al*, 2007) war die Reinigung des rekombinant hergestellten *A. nidulans* GcnE nicht erfolgreich. Das Protein war entweder unlöslich oder wurde prozessiert. Demzufolge konnten keine *in vitro*-Studien durchgeführt werden. Zur Löslichkeit des Proteins würde möglicherweise eine Koexpression mit dem Interaktionspartner AdaB beitragen, dies wurde jedoch nicht versucht. *In vivo*-Interaktionsstudien zwischen dem CBC und GcnE mittels Bimolekularer Fluoreszenz Komplementations-Analyse zeigten keine Fluoreszenz-Signale, was darauf schließen lässt, dass es unter den getesteten Bedingungen keine *in vivo*-Interaktion zwischen dem CBC und GcnE gibt.

Ein weiterer Marker für transkriptionell aktives Chromatin ist die Mono-Ubiquitinierung von H2B am Lysinrest 123 in Hefe (Lysinrest 120 in Säugetieren) und dessen Deubiquitinierung (Osley *et al*, 2006). Für die Ubiquitinierung von H2B sind die Enzyme E2 (Rad6) und E3 (Bre1) verantwortlich. Die Deletion der Gene für diese einzelnen Enzyme verursachte einen starken Wachstumsdefekt in Hefe. In *A. nidulans* existieren zwei Orthologe des E2-Enzyms Rad6 und ein Ortholog des E3-Enzyms Bre1. Die Deletion des durch AN8258 kodierten E2 Orthologs in *A. nidulans* führte zu keiner phänotypischen Veränderung des Pilzes, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass das zweite Rad6 Ortholog (AN2761) die Funktion des anderen übernimmt. Eine Deletion der zwei anderen Enzyme bzw. eine Doppeldeletion der Rad6-Orthologen war bisher nicht erfolgreich. Die Deubiquitinierung von H2B wird, sowohl im Menschen als auch in Hefe, durch eine Komponente des SAGA-Komplexes katalysiert, Ubp8 (Henry *et al*, 2003; Lang *et al*, 2011). Interessanterweise fehlt diese Untereinheit dem SAGA-Komplex in *A. nidulans* (Georgakopoulos *et al*, 2012). Dies lässt vermuten, dass es entweder keine H2B-Ubiquitinierung in *A. nidulans* gibt oder die Deubiquitinierung durch ein anderes Enzym ausgeführt wird. Studien zum NF-Y-Komplex zeigten, dass der Ubiquitinierung von H2B eine Mono-Ubiquitinierung von NF-YB am Lysinrest 138 voran geht (Nardini *et al*, 2013). Eine Mutation des äquivalenten Lysinrests 129 von HapC in *A. nidulans* hatte jedoch keinerlei Auswirkungen auf den Phänotyp von *A. nidulans*. Demnach scheint eine post-translationale Modifikation an diesem konservierten

Lysin nicht essentiell für das Wachstum des Pilzes zu sein. Des Weiteren konnten mittels Western Blot- und LC-MS/MS-Analysen keine Ubiquitinierungen für die CBC-Untereinheiten und dessen Koimmunopräzipitate, den Kernhistonen und dem HapY nachgewiesen werden. Demzufolge scheinen auch Ubiquitinierungen für die transkriptionelle Aktivierung des CBCs in *A. nidulans* keine Rolle zu spielen. Besonders interessant ist, dass auch für H2B keine Ubiquitinierung detektiert werden konnte. Dieses Ergebnis korreliert mit der Vermutung, dass es H2B-Ubiquitinierungen in *A. nidulans* möglicherweise nicht gibt. Für eine konkrete Aussage sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich.

4 Einfluss des CBCs auf den Sekundärmetabolismus

Neben einer Reihe von Genen, die in den Zellzyklus involviert sind oder für das Wachstum und die Entwicklung des Pilzes eine Rolle spielen, reguliert der CBC auch Sekundärmetabolit-Gencluster. Beispielsweise ist der CBC an der Aktivierung der Penicillin-Biosynthesegene *ipnA* und *aatA* in *A. nidulans* beteiligt (Litzka *et al*, 1996; Litzka *et al*, 1999; Then Bergh *et al*, 1996). In *A. fumigatus* ist der CBC unter anderem ein Aktivator der Pseurotin- und Fumitremorgin C-Biosynthese. Dies wurde anhand quantitativer HPLC-Analysen der Kulturüberstände von *A. fumigatus* Wildtyp und $\Delta hapC$ -Mutante nachgewiesen (diese Arbeit, Daten nicht gezeigt). Proteomanalysen der *A. nidulans* $\Delta hapC$ -Mutante belegten eine erhöhte Synthese eines Proteins unbekannter Funktion, dessen kodierendes Gen AN7894 in einem Sekundärmetabolit-Gencluster lokalisiert ist. Viele der Biosynthese-Gencluster sind unter Standard-Laborbedingungen still, d. h. die Gene werden vom Pilz nicht expremiert (Brakhage, 2013). In einem dieser Gencluster befindet sich das Gen AN7894. Eine Aktivierung des Genclusters konnte durch Koinkubation von *A. nidulans* und *S. rapamycinicus* demonstriert werden, jedoch konnte aus dem Kulturüberstand kein korrespondierender Naturstoff isoliert werden (Schroeckh *et al*, 2009). Die Expression der Gene dieses Clusters konnte zum Großteil in der $\Delta hapC$ -Mutante nachgewiesen werden. Dennoch wurde in den Kulturüberständen keine Substanz gefunden, die im Zusammenhang mit diesem Cluster stehen könnte. Transkriptom-, Proteom- und Metabolom-Analysen einer Δcsn -Mutante zeigten ebenso eine Aktivierung dieses Clusters. Der COP9-Signalsome-Komplex (CSN) ist ein wichtiger Regulator der Ubiquitin-Ligasen. Das Fehlen von CNS führt ähnlich wie das Fehlen vom CBC zu einer verschlechterten Redoxregulation und zu einer Hypersensitivität gegenüber oxidativem Stress (Nahlik *et al*, 2010). Gerke *et al* (2012) definierten die Ränder des Clusters von Lokus AN7896 bis AN7903 und nannten es *dba* Gencluster aufgrund der isolierten Substanz, 2,4-Dihydroxy-3-Methyl-6-(2-Oxopropyl)-

Benzaldehyd (DHMBA). Das Gencluster beinhaltet eine Polyketidsynthase, die durch *dbal* (AN7903) kodiert wird. Polyketidsynthasen (PKS) und Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) sind Kernenzyme für die Biosynthese von Sekundärmetaboliten (Brakhage, 2013). Es wird vermutet, dass die verschlechterte oxidative Stressantwort der Δ *csn*-Mutante zur Akkumulation seltener Sekundärmetabolite führt. Schlussfolgernd würde man ebenfalls für die Δ *hapC*-Mutante zusätzliche Sekundärmetabolite erwarten. Möglicherweise waren die Zeitpunkte für die Analysen zu früh gewählt oder es spielen weitere Faktoren für die finale Produktion der Substanz eine Rolle. Generell scheint der CBC ein Repressor dieser *dba*-Clustergene zu sein.

5 Proteom-Analysen von *A. nidulans*

Die vollständige Sequenzierung des Genoms von *A. nidulans* (Galagan *et al*, 2005) sowie die kontinuierlichen Verbesserungen der *Aspergillus* Genom-Datenbank (Arnaud *et al*, 2012; Cerqueira *et al*, 2014) liefern die Grundlage für globale Analysen auf Transkriptom- und Proteomebene. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig eine umfassende 2D-Proteomkarte vom *A. nidulans*-Proteom erstellt, die als Grundlage für weiterführende vergleichende Proteomanalysen dient. Die 2D-Gelelektrophorese bietet die Möglichkeit, komplexe Proteinextrakte in Einzelproteine aufzutrennen und zu visualisieren. Außerdem können biologisch bedeutende post-translationale Modifikationen (PTM), wie Phosphorylierungen und Glykosylierungen, anhand des Laufverhaltens der Proteine direkt erkannt und identifiziert werden, was der Analyse zellulärer und molekularer Abläufe auf Proteinebene dient (Barnouin, 2004). 70 verschiedene Proteine wiesen mehr als einen Proteinpunkt auf der Proteomkarte auf, was auf post-translationale Modifikationen hindeutet. Des Weiteren konnten 25 hypothetische Proteine in ihrer Existenz bestätigt werden, deren funktionelle Analyse Gegenstand weiterer Untersuchungen sein könnte. Entgegen den Vorteilen dieser Methode werden hier auch die Nachteile der gelbasierten Proteomanalyse deutlich. Aufgrund unterschiedlicher Limitierungen, wie pH-Bereich, MW-Bereich, Hydrophobizität der Proteine und Sensitivität der Coomassiefärbung konnten nur etwa 3 % des gesamten Proteoms von *A. nidulans* mittels des 2D-Gels dargestellt werden. Eine modernere und sensitivere Methode wäre die gel-freie Proteomik mittels LC-MS/MS-Analyse. Diese Methode kann mittlerweile auch für differentielle Analysen verwendet werden, in dem die Proteinproben mit unterschiedlichen Reagenzien markiert werden (Otto *et al*, 2014).

Der CBC ist ein globaler Regulator der Zelle. Die Inaktivierung dieses Transkriptionsfaktor-Komplexes verursacht drastische Wachstums- und Entwicklungsdefekte in *A. nidulans* und

anderen Eukaryoten. In dieser Arbeit wurde die Auswirkung der Deletion von *hapC* auf das Proteom von *A. nidulans* untersucht. Ergänzend zu den bereits existierenden Proteomdaten der Δ *hapC*-Mutante hinsichtlich Proteine mit antioxidativer Wirkung (Thön *et al.*, 2010) wurde in dieser Arbeit ein spezieller Fokus auf Proteine gelegt, die am Wachstum und der Entwicklung des Pilzes beteiligt sind. Dazu wurden die Kultivierungsbedingungen angepasst und eine hoch sensitive Multiplex-Fluoreszenz 2D-Gelelektrophorese-Methode angewendet.

Insgesamt wurden durch die hier durchgeführten Proteomanalysen 35 verschiedene Proteine identifiziert, die in der Δ *hapC*-Mutante mehr als 2fach differenziell synthetisiert wurden. Davon wurden 20 Proteine vermehrt in *A. nidulans* Δ *hapC* gebildet, 14 Proteine vermindert und ein Protein scheint post-translational modifiziert zu sein. Die differenziell synthetisierten Proteine wurden nach ihrer Funktion in Kategorien eingeordnet, die hier näher analysiert wurden. Der Großteil der Proteine wurde den Kategorien Wachstum und Entwicklung, Kohlenhydratmetabolismus und dem Elektronentransport und Respiration zugeordnet. Prozesse der Energiegewinnung wie die Atmungskette und der Kohlenhydratmetabolismus sind in der Δ *hapC*-Mutante stark herunter reguliert. Diese Ergebnisse korrelieren mit den phänotypischen Eigenschaften der Mutante. Besonderes Interesse gilt der Kategorie Wachstum und Entwicklung. Im Folgenden werden einzelne Proteine aus dieser Kategorie näher betrachtet.

Die *A. nidulans* Δ *hapC*-Mutante zeigt eine verstärkte Bildung zweier Proteine, die in die Familie der 14-3-3 Proteine eingeordnet werden. Dieser Proteinfamilie gehören kleine, saure, hoch konservierte Proteine an, die durch die Interaktion mit anderen Proteinen eine Vielzahl zellulärer Prozesse in Eukaryoten vermittelt (van Heusden, 2009). In *A. fumigatus* wurde eine verstärkte Synthese dieses Proteins in Anwesenheit von H_2O_2 nachgewiesen (Lessing *et al.*, 2007). Für *S. cerevisiae* konnte eine Beteiligung des 14-3-3 Proteins BHML1 am Schutz vor ROS und Apoptose gezeigt werden (Clapp *et al.*, 2012). Eine Überproduktion des ArtA-Proteins in *A. nidulans* führte zu einem Defekt in der Auskeimung und Sporulation des Pilzes. Es wird vermutet, dass ArtA an der Regulation des polaren Wachstums von *A. nidulans* beteiligt ist (Kraus *et al.*, 2002). Diese Daten korrelieren mit den phänotypischen Eigenschaften der Δ *hapC*-Mutante. Ein weiteres Protein aus dieser Kategorie, welches eine gesteigerte Synthese im Δ *hapC*-Stamm zeigte, ist das Septin AspB. Septine gehören zu der hoch konservierten Familie der Zytoskelett-Proteine, die in die Zytogenese und Morphogenese von *S. cerevisiae* und *Drosophila melanogaster* involviert sind (Longtine *et al.*, 1996; Neufeld & Rubin, 1994). In *A. nidulans* ist AspB wichtig für die Sporulation und das polare Wachstum des Pilzes (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2012). Möglicherweise wird das

Protein in höheren Mengen synthetisiert, um vorhandene Defekte auszugleichen. Die Inaktivierung des CBCs führte außerdem zu einer verminderten Bildung der Katalase B. Die CBC-abhängige Regulation der Katalase ist bereits aus Transkriptom-Analysen bekannt, konnte jedoch auf Proteom-Ebene in *A. nidulans* $\Delta hapC$ bisher nicht nachgewiesen werden (Thön *et al.*, 2010). In *A. nidulans* ist die Katalase B ein bekanntes Enzym, welches an Wachstum und Sporulation des Pilzes beteiligt ist, aber auch der Detoxifizierung von H_2O_2 dient (Kawasaki *et al.*, 1997). Die verminderte Bildung der Katalase B in *A. nidulans* $\Delta hapC$ ist sehr wahrscheinlich ein Grund für die Sensitivität des Stammes gegenüber oxidativen Stress und möglicherweise auch für den Defekt in der asexuellen Entwicklung des Pilzes verantwortlich. Weiterhin wird ein Rho-GDP Dissoziationsinhibitor (RDI) vermehrt durch die *hapC*-Deletionsmutante produziert. In *S. cerevisiae* sind RDIs involviert in die Lokalisation und Regulation von Cdc42, welches wiederum am polaren Wachstum der Hefe beteiligt ist (Dighe & Kozminski, 2014; Richman *et al.*, 2004). In *Ustilago maydis* ist Rdi1 ebenfalls ein Regulator von Cdc42. Eine Überexpression des Gens führte zu abgerundeten Zellen, eine Deletion zeigte jedoch keinerlei Effekte. Demnach scheint dieses Protein in erhöhten Mengen in *U. maydis* einen Einfluss auf das polare Wachstum zu haben (Hlubek *et al.*, 2008). Schlussfolgernd für *A. nidulans* würde man erwarten, dass durch die gesteigerte Bildung von Rdi die $\Delta hapC$ -Mutante ein verändertes Hyphenwachstum aufweist, jedoch konnte diesbezüglich kein Effekt beobachtet werden. Eine Deletion des für RDI kodierenden Gens zeigte auch in *A. nidulans* keine Effekte (diese Arbeit, Daten nicht gezeigt).

Verglichen mit den bereits bekannten Proteom-Daten des $\Delta hapC$ -Stammes, kultiviert unter oxidativen Stress (Thön *et al.*, 2010), konnten nur 6 Übereinstimmungen gefunden werden. Dies ist vermutlich auf Abweichungen der Kultivierungsbedingungen zurück zu führen.

REFERENZEN

- Adams TH, Wieser JK, Yu JH (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 35-54
- Ahmad K, Henikoff S (2002) Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99 Suppl 4**: 16477-16484
- Aravind L, Landsman D (1998) AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* **26**: 4413-4421
- Arents G, Moudrianakis EN (1995) The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11170-11174
- Arnaud MB, Cerqueira GC, Inglis DO, Skrzypek MS, Binkley J, Chibucos MC, Crabtree J, Howarth C, Orvis J, Shah P, Wymore F, Binkley G, Miyasato SR, Simison M, Sherlock G, Wortman JR (2012) The *Aspergillus* Genome Database (AspGD): recent developments in comprehensive multispecies curation, comparative genomics and community resources. *Nucleic Acids Res* **40**: D653-659
- Avvakumov N, Nourani A, Cote J (2011) Histone chaperones: modulators of chromatin marks. *Mol Cell* **41**: 502-514
- Balasubramanian R, Pray-Grant MG, Selleck W, Grant PA, Tan S (2002) Role of the Ada2 and Ada3 transcriptional coactivators in histone acetylation. *J Biol Chem* **277**: 7989-7995
- Ballance DJ, Turner G (1985) Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene* **36**: 321-331
- Bannister AJ, Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* **21**: 381-395
- Bannister AJ, Schneider R, Kouzarides T (2002) Histone methylation: dynamic or static? *Cell* **109**: 801-806
- Barnouin K (2004) Two-dimensional gel electrophoresis for analysis of protein complexes. *Methods Mol Biol* **261**: 479-498
- Barrios A, Selleck W, Hnatkovich B, Kramer R, Sermwittayawong D, Tan S (2007) Expression and purification of recombinant yeast Ada2/Ada3/Gcn5 and Piccolo NuA4 histone acetyltransferase complexes. *Methods* **41**: 271-277
- Becker DM, Fikes JD, Guarente L (1991) A cDNA encoding a human CCAAT-binding protein cloned by functional complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 1968-1972
- Bellorini M, Lee DK, Dantonel JC, Zemzoumi K, Roeder RG, Tora L, Mantovani R (1997) CCAAT binding NF-Y-TBP interactions: NF-YB and NF-YC require short domains adjacent to their histone fold motifs for association with TBP basic residues. *Nucleic Acids Res* **25**: 2174-2181

- Bergmann S, Schumann J, Scherlach K, Lange C, Brakhage AA, Hertweck C (2007) Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nat Chem Biol* **3**: 213-217
- Billon P, Cote J (2013) Precise deposition of histone H2A.Z in chromatin for genome expression and maintenance. *Biochim Biophys Acta* **1819**: 290-302
- Bok JW, Hoffmeister D, Maggio-Hall LA, Murillo R, Glasner JD, Keller NP (2006) Genomic mining for *Aspergillus* natural products. *Chem Biol* **13**: 31-37
- Bönisch C, Hake SB (2012) Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable? *Nucleic Acids Res* **40**: 10719-10741
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brakhage AA (1998) Molecular regulation of beta-lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 547-585
- Brakhage AA (2013) Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat Rev Microbiol* **11**: 21-32
- Brakhage AA, Al-Abdallah Q, Tüncher A, Spröte P (2005) Evolution of beta-lactam biosynthesis genes and recruitment of *trans*-acting factors. *Phytochemistry* **66**: 1200-1210
- Brakhage AA, Andrianopoulos A, Kato M, Steidl S, Davis MA, Tsukagoshi N, Hynes MJ (1999) HAP-Like CCAAT-binding complexes in filamentous fungi: implications for biotechnology. *Fungal Genet Biol* **27**: 243-252
- Brakhage AA, Schuermann J, Bergmann S, Scherlach K, Schroeckh V, Hertweck C (2008) Activation of fungal silent gene clusters: a new avenue to drug discovery. *Prog Drug Res* **66**: 1, 3-12
- Brakhage AA, Spröte P, Al-Abdallah Q, Gehrke A, Plattner H, Tüncher A (2004) Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **88**: 45-90
- Bucher P (1990) Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J Mol Biol* **212**: 563-578
- Bucher P, Trifonov EN (1988) CCAAT box revisited: bidirectionality, location and context. *J Biomol Struct Dyn* **5**: 1231-1236
- Buschlen S, Amillet JM, Guiard B, Fournier A, Marcireau C, Bolotin-Fukuhara M (2003) The *S. cerevisiae* Hap complex, a key regulator of mitochondrial function, coordinates nuclear and mitochondrial gene expression. *Comp Funct Genomics* **4**: 37-46
- Caretti G, Motta MC, Mantovani R (1999) NF-Y associates with H3-H4 tetramers and octamers by multiple mechanisms. *Mol Cell Biol* **19**: 8591-8603
- Cerqueira GC, Arnaud MB, Inglis DO, Skrzypek MS, Binkley G, Simison M, Miyasato SR, Binkley J, Orvis J, Shah P, Wymore F, Sherlock G, Wortman JR (2014) The *Aspergillus* Genome Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. *Nucleic Acids Res* **42**: D705-710

- Chae HD, Yun J, Bang YJ, Shin DY (2004) Cdk2-dependent phosphorylation of the NF-Y transcription factor is essential for the expression of the cell cycle-regulatory genes and cell cycle G1/S and G2/M transitions. *Oncogene* **23**: 4084-4088
- Chan QK, Lam HM, Ng CF, Lee AY, Chan ES, Ng HK, Ho SM, Lau KM (2010) Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent upregulation of p21, and induction of G(2) cell-cycle arrest. *Cell Death Differ* **17**: 1511-1523
- Choudhary C, Kumar C, Gnäd F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* **325**: 834-840
- Clapier CR, Cairns BR (2009) The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* **78**: 273-304
- Clapp C, Portt L, Khoury C, Sheibani S, Norman G, Ebner P, Eid R, Vali H, Mandato CA, Madeo F, Greenwood MT (2012) 14-3-3 protects against stress-induced apoptosis. *Cell Death Dis* **3**: e348
- Clarkson MJ, Wells JR, Gibson F, Saint R, Tremethick DJ (1999) Regions of variant histone His2AvD required for *Drosophila* development. *Nature* **399**: 694-697
- Coustry F, Sinha S, Maity SN, Crombrughe B (1998) The two activation domains of the CCAAT-binding factor CBF interact with the dTAFII110 component of the *Drosophila* TFIID complex. *Biochem J* **331** (Pt 1): 291-297
- Cowart RE, Singleton FL, Hind JS (1993) A comparison of bathophenanthrolinedisulfonic acid and ferrozine as chelators of iron(II) in reduction reactions. *Anal Biochem* **211**: 151-155
- Currie RA (1997) Functional interaction between the DNA binding subunit trimerization domain of NF-Y and the high mobility group protein HMG-I(Y). *J Biol Chem* **272**: 30880-30888
- Currie RA (1998) NF-Y is associated with the histone acetyltransferases GCN5 and P/CAF. *J Biol Chem* **273**: 1430-1434
- Dighe SA, Kozminski KG (2014) Secretory vesicles deliver Cdc42p to sites of polarized growth in *S. cerevisiae*. *PLoS One* **9**: e99494
- Doby JM, Kombila-Favry M (1978) [Presence of sexual forms (cleistothecia and Hülle cells) in a case of human maxillary sinus aspergillosis caused by *Aspergillus nidulans* in association with *Aspergillus fumigatus*]. *Mycopathologia* **64**: 157-163
- Dolfini D, Gatta R, Mantovani R (2012) NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **47**: 29-49
- Falbo KB, Shen X (2009) Histone modifications during DNA replication. *Mol Cells* **28**: 149-154
- Fan JY, Gordon F, Luger K, Hansen JC, Tremethick DJ (2002) The essential variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nat Struct Biol* **9**: 172-176

- Faniello MC, Bevilacqua MA, Condorelli G, de Crombrughe B, Maity SN, Avvedimento VE, Cimino F, Costanzo F (1999) The B subunit of the CAAT-binding factor NFY binds the central segment of the Co-activator p300. *J Biol Chem* **274**: 7623-7626
- Fleming JD, Pavesi G, Benatti P, Imbriano C, Mantovani R, Struhl K (2013) NF-Y coassociates with FOS at promoters, enhancers, repetitive elements, and inactive chromatin regions, and is stereo-positioned with growth-controlling transcription factors. *Genome Res* **23**: 1195-1209
- Fletcher TM, Hansen JC (1995) Core histone tail domains mediate oligonucleosome folding and nucleosomal DNA organization through distinct molecular mechanisms. *J Biol Chem* **270**: 25359-25362
- Fonfria-Subiros E, Acosta-Reyes F, Saperas N, Pous J, Subirana JA, Campos JL (2012) Crystal structure of a complex of DNA with one AT-hook of HMGA1. *PLoS One* **7**: e37120
- Forsburg SL, Guarente L (1989) Identification and characterization of HAP4: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes Dev* **3**: 1166-1178
- Fraser JA, Davis MA, Hynes MJ (2001) The formamidase gene of *Aspergillus nidulans*: regulation by nitrogen metabolite repression and transcriptional interference by an overlapping upstream gene. *Genetics* **157**: 119-131
- Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, Batzoglou S, Lee SI, Basturkmen M, Spevak CC, Clutterbuck J, Kapitonov V, Jurka J, Scazzocchio C, Farman M, Butler J, Purcell S, Harris S, Braus GH, Draht O, Busch S, D'Enfert C, Bouchier C, Goldman GH, Bell-Pedersen D, Griffiths-Jones S, Doonan JH, Yu J, Vienken K, Pain A, Freitag M, Selker EU, Archer DB, Penalva MA, Oakley BR, Momany M, Tanaka T, Kumagai T, Asai K, Machida M, Nierman WC, Denning DW, Caddick M, Hynes M, Paoletti M, Fischer R, Miller B, Dyer P, Sachs MS, Osmani SA, Birren BW (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**: 1105-1115
- Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA (2007) The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud Mycol* **59**: 1-10
- Georgakopoulos P, Lockington RA, Kelly JM (2012) SAGA complex components and acetate repression in *Aspergillus nidulans*. *G3 (Bethesda)* **2**: 1357-1367
- Georgakopoulos P, Lockington RA, Kelly JM (2013) The Spt-Ada-Gcn5 Acetyltransferase (SAGA) complex in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **8**: e65221
- Georgakopoulos T, Thireos G (1992) Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *EMBO J* **11**: 4145-4152
- Gerke J, Bayram O, Feussner K, Landesfeind M, Shelest E, Feussner I, Braus GH (2012) Breaking the silence: protein stabilization uncovers silenced biosynthetic gene clusters in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Appl Environ Microbiol* **78**: 8234-8244
- Goldman GH, Osmani SA (2007) *The Aspergilli - Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*, Vol. 26, Boca Raton London New York: CRC Press, Taylor & Francis Group.

- Gsaller F, Eisendle M, Lechner BE, Schrettl M, Lindner H, Muller D, Geley S, Haas H (2012) The interplay between vacuolar and siderophore-mediated iron storage in *Aspergillus fumigatus*. *Metallomics* **4**: 1262-1270
- Gsaller F, Hortschansky P, Beattie SR, Klammer V, Tuppatsch K, Lechner BE, Rietzschel N, Werner ER, Vogan AA, Chung D, Muhlenhoff U, Kato M, Cramer RA, Brakhage AA, Haas H (2014) The Janus transcription factor HapX controls fungal adaptation to both iron starvation and iron excess. *EMBO J*: [Epub ahead of print]
- Guillemette B, Bataille AR, Gevry N, Adam M, Blanchette M, Robert F, Gaudreau L (2005) Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol* **3**: e384
- Gurtner A, Fuschi P, Magi F, Colussi C, Gaetano C, Dobbelstein M, Sacchi A, Piaggio G (2008) NF-Y dependent epigenetic modifications discriminate between proliferating and postmitotic tissue. *PLoS One* **3**: e2047
- Hamer D (1951) Amino-acid composition of thymus histone. *Nature* **167**: 40
- Henry KW, Wyce A, Lo WS, Duggan LJ, Emre NC, Kao CF, Pillus L, Shilatifard A, Osley MA, Berger SL (2003) Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev* **17**: 2648-2663
- Hernandez-Rodriguez Y, Hastings S, Momany M (2012) The septin AspB in *Aspergillus nidulans* forms bars and filaments and plays roles in growth emergence and conidiation. *Eukaryot Cell* **11**: 311-323
- Hlubek A, Schink KO, Mahlert M, Sandrock B, Bolker M (2008) Selective activation by the guanine nucleotide exchange factor Don1 is a main determinant of Cdc42 signalling specificity in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **68**: 615-623
- Holm L, Rosenstrom P (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* **38**: W545-549
- Hortschansky P, Eisendle M, Al-Abdallah Q, Schmidt AD, Bergmann S, Thön M, Kniemeyer O, Abt B, Seeber B, Werner ER, Kato M, Brakhage AA, Haas H (2007) Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex--a novel mechanism of gene regulation by iron. *EMBO J* **26**: 3157-3168
- Huber EM, Scharf DH, Hortschansky P, Groll M, Brakhage AA (2012) DNA minor groove sensing and widening by the CCAAT-binding complex. *Structure* **20**: 1757-1768
- Iouzalén N, Moreau J, Mechali M (1996) H2A.ZI, a new variant histone expressed during *Xenopus* early development exhibits several distinct features from the core histone H2A. *Nucleic Acids Res* **24**: 3947-3952
- Jackson JD, Gorovsky MA (2000) Histone H2A.Z has a conserved function that is distinct from that of the major H2A sequence variants. *Nucleic Acids Res* **28**: 3811-3816
- Jansen A, Verstrepen KJ (2011) Nucleosome positioning in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 301-320
- Jeram SM, Srikumar T, Pedrioli PG, Raught B (2009) Using mass spectrometry to identify ubiquitin and ubiquitin-like protein conjugation sites. *Proteomics* **9**: 922-934

- Jin S, Scotto KW (1998) Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y. *Mol Cell Biol* **18**: 4377-4384
- Kato M (2005) An overview of the CCAAT-box binding factor in filamentous fungi: assembly, nuclear translocation, and transcriptional enhancement. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**: 663-672
- Kato M, Aoyama A, Naruse F, Kobayashi T, Tsukagoshi N (1997) An *Aspergillus nidulans* nuclear protein, AnCP, involved in enhancement of Taka-amylase A gene expression, binds to the CCAAT-containing *taaG2*, *amdS*, and *gatA* promoters. *Mol Gen Genet* **254**: 119-126
- Kato M, Aoyama A, Naruse F, Tateyama Y, Hayashi K, Miyazaki M, Papagiannopoulos P, Davis MA, Hynes MJ, Kobayashi T, Tsukagoshi N (1998) The *Aspergillus nidulans* CCAAT-binding factor AnCP/AnCF is a heteromeric protein analogous to the HAP complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **257**: 404-411
- Kato M, Naruse F, Kobayashi T, Tsukagoshi N (2001) No factors except for the hap complex increase the Taka-amylase A gene expression by binding to the CCAAT sequence in the promoter region. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**: 2340-2342
- Kato M, Tateyama Y, Hayashi K, Naruse F, Oonishi R, Tanoue S, Tanaka A, Kobayashi T, Tsukagoshi N (2002) A quantity control mechanism regulating levels of the HapE subunit of the Hap complex in *Aspergillus nidulans*: no accumulation of HapE in *hapC* deletion mutants. *FEBS Lett* **512**: 227-229
- Kawasaki L, Wysong D, Diamond R, Aguirre J (1997) Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J Bacteriol* **179**: 3284-3292
- Kim J, Guermah M, McGinty RK, Lee JS, Tang Z, Milne TA, Shilatifard A, Muir TW, Roeder RG (2009) RAD6-Mediated transcription-coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human cells. *Cell* **137**: 459-471
- Kim J, Roeder RG (2009) Direct Brel-PafI complex interactions and RING finger-independent Brel-Rad6 interactions mediate histone H2B ubiquitylation in yeast. *J Biol Chem* **284**: 20582-20592
- Kinghorn JR, Unkles SE (1994) Inorganic nitrogen assimilation: molecular aspects. *Prog Ind Microbiol* **29**: 181-194
- Kniemeyer O, Lessing F, Scheibner O, Hertweck C, Brakhage AA (2006) Optimisation of a 2-D gel electrophoresis protocol for the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Curr Genet* **49**: 178-189
- Kodama Y, Hu CD (2012) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives. *Biotechniques* **53**: 285-298
- Krappmann S, Jung N, Medic B, Busch S, Prade RA, Braus GH (2006) The *Aspergillus nidulans* F-box protein GrrA links SCF activity to meiosis. *Mol Microbiol* **61**: 76-88
- Kraus PR, Hofmann AF, Harris SD (2002) Characterization of the *Aspergillus nidulans* 14-3-3 homologue, ArtA. *FEMS Microbiol Lett* **210**: 61-66

- Kriangkripiat T, Momany M (2009) *Aspergillus nidulans* protein O-mannosyltransferases play roles in cell wall integrity and developmental patterning. *Eukaryot Cell* **8**: 1475-1485
- Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105-132
- Lang G, Bonnet J, Umlauf D, Karmodiya K, Koffler J, Stierle M, Devys D, Tora L (2011) The tightly controlled deubiquitination activity of the human SAGA complex differentially modifies distinct gene regulatory elements. *Mol Cell Biol* **31**: 3734-3744
- Lee H, Bien CM, Hughes AL, Espenshade PJ, Kwon-Chung KJ, Chang YC (2007) Cobalt chloride, a hypoxia-mimicking agent, targets sterol synthesis in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **65**: 1018-1033
- Lee JS, Smith E, Shilatifard A (2010) The language of histone crosstalk. *Cell* **142**: 682-685
- Lenouvel F, van de Vondervoort PJ, Visser J (2002) Disruption of the *Aspergillus niger argB* gene: a tool for transformation. *Curr Genet* **41**: 425-432
- Lessing F, Kniemeyer O, Wozniok I, Loeffler J, Kurzai O, Haertl A, Brakhage AA (2007) The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryot Cell* **6**: 2290-2302
- Li Q, Herrler M, Landsberger N, Kaludov N, Ogryzko VV, Nakatani Y, Wolffe AP (1998) *Xenopus* NF-Y pre-sets chromatin to potentiate p300 and acetylation-responsive transcription from the *Xenopus* hsp70 promoter *in vivo*. *EMBO J* **17**: 6300-6315
- Liberati C, Ronchi A, Lievens P, Ottolenghi S, Mantovani R (1998a) NF-Y organizes the gamma-globin CCAAT boxes region. *J Biol Chem* **273**: 16880-16889
- Liberati C, Sgarra R, Manfioletti G, Mantovani R (1998b) DNA binding of NF-Y: the effect of HMGI proteins depends upon the CCAAT box. *FEBS Lett* **433**: 174-178
- Lin SC (2006) Identification of an NF-Y/HMG-I(Y)-binding site in the human IL-10 promoter. *Mol Immunol* **43**: 1325-1331
- Littlejohn TG, Hynes MJ (1992) Analysis of the site of action of the *amdR* product for regulation of the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **235**: 81-88
- Litzka O, Papagiannopolous P, Davis MA, Hynes MJ, Brakhage AA (1998) The penicillin regulator PENR1 of *Aspergillus nidulans* is a HAP-like transcriptional complex. *Eur J Biochem* **251**: 758-767
- Litzka O, Then Bergh K, Brakhage AA (1996) The *Aspergillus nidulans* penicillin-biosynthesis gene *aat* (penDE) is controlled by a CCAAT-containing DNA element. *Eur J Biochem* **238**: 675-682
- Litzka O, Then Bergh K, Van den Brulle J, Steidl S, Brakhage AA (1999) Transcriptional control of expression of fungal beta-lactam biosynthesis genes. *Antonie Van Leeuwenhoek* **75**: 95-105
- Liu J, Perumal NB, Oldfield CJ, Su EW, Uversky VN, Dunker AK (2006) Intrinsic disorder in transcription factors. *Biochemistry* **45**: 6873-6888

- Lo WS, Trievel RC, Rojas JR, Duggan L, Hsu JY, Allis CD, Marmorstein R, Berger SL (2000) Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked *in vitro* and *in vivo* to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell* **5**: 917-926
- Longtine MS, DeMarini DJ, Valencik ML, Al-Awar OS, Fares H, De Virgilio C, Pringle JR (1996) The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 106-119
- Lucas I, Palakodeti A, Jiang Y, Young DJ, Jiang N, Fernald AA, Le Beau MM (2007) High-throughput mapping of origins of replication in human cells. *EMBO Rep* **8**: 770-777
- Luger K, Dechassa ML, Tremethick DJ (2012) New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 436-447
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251-260
- Maity SN, de Crombrughe B (1998) Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription. *Trends Biochem Sci* **23**: 174-178
- Manni I, Caretti G, Artuso S, Gurtner A, Emiliozzi V, Sacchi A, Mantovani R, Piaggio G (2008) Posttranslational regulation of NF-YA modulates NF-Y transcriptional activity. *Mol Biol Cell* **19**: 5203-5213
- Mantovani R (1998) A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic Acids Res* **26**: 1135-1143
- Mantovani R (1999) The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* **239**: 15-27
- McNabb DS, Xing Y, Guarente L (1995) Cloning of yeast HAP5: a novel subunit of a heterotrimeric complex required for CCAAT binding. *Genes Dev* **9**: 47-58
- Meneghini MD, Wu M, Madhani HD (2003) Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* **112**: 725-736
- Micheli PA (1729) *Nova plantarum genera juxta Tournefortii methodum disposita*, Florence, Italy.
- Millar CB (2013) Organizing the genome with H2A histone variants. *Biochem J* **449**: 567-579
- Miller JH (1972) *Experiments in molecular genetics*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* **20**: 87-90
- Nagata O, Takashima T, Tanaka M, Tsukagoshi N (1993) *Aspergillus nidulans* nuclear proteins bind to a CCAAT element and the adjacent upstream sequence in the promoter region of the starch-inducible Taka-amylase A gene. *Mol Gen Genet* **237**: 251-260
- Nahlik K, Dumkow M, Bayram O, Helmstaedt K, Busch S, Valerius O, Gerke J, Hoppert M, Schwier E, Opitz L, Westermann M, Grond S, Feussner K, Goebel C, Kaever A, Meinicke P, Feussner I, Braus GH (2010) The COP9 signalosome mediates

- transcriptional and metabolic response to hormones, oxidative stress protection and cell wall rearrangement during fungal development. *Mol Microbiol* **78**: 964-979
- Nardini M, Gnesutta N, Donati G, Gatta R, Forni C, Fossati A, Vonnrhein C, Moras D, Romier C, Bolognesi M, Mantovani R (2013) Sequence-specific transcription factor NF-Y displays histone-like DNA binding and H2B-like ubiquitination. *Cell* **152**: 132-143
- Nayak T, Szewczyk E, Oakley CE, Osmani A, Ukil L, Murray SL, Hynes MJ, Osmani SA, Oakley BR (2006) A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**: 1557-1566
- Neufeld TP, Rubin GM (1994) The *Drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. *Cell* **77**: 371-379
- Ng SS, Yue WW, Oppermann U, Klose RJ (2009) Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cell Mol Life Sci* **66**: 407-422
- Nützmann HW, Reyes-Dominguez Y, Scherlach K, Schroeckh V, Horn F, Gacek A, Schumann J, Hertweck C, Strauss J, Brakhage AA (2011) Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 14282-14287
- Olesen J, Hahn S, Guarente L (1987) Yeast HAP2 and HAP3 activators both bind to the CYC1 upstream activation site, UAS2, in an interdependent manner. *Cell* **51**: 953-961
- Osley MA, Fleming AB, Kao CF (2006) Histone ubiquitylation and the regulation of transcription. *Results Probl Cell Differ* **41**: 47-75
- Otto A, Becher D, Schmidt F (2014) Quantitative proteomics in the field of microbiology. *Proteomics* **14**: 547-565
- Papagiannopoulos P, Andrianopoulos A, Sharp JA, Davis MA, Hynes MJ (1996) The *hapC* gene of *Aspergillus nidulans* is involved in the expression of CCAAT-containing promoters. *Mol Gen Genet* **251**: 412-421
- Pinkham JL, Olesen JT, Guarente LP (1987) Sequence and nuclear localization of the *Saccharomyces cerevisiae* HAP2 protein, a transcriptional activator. *Mol Cell Biol* **7**: 578-585
- Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, Macdonald KD, Bufton AW (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* **5**: 141-238
- Rando OJ, Chang HY (2009) Genome-wide views of chromatin structure. *Annu Rev Biochem* **78**: 245-271
- Reeves R (2000) Structure and function of the HMGI(Y) family of architectural transcription factors. *Environ Health Perspect* **108 Suppl 5**: 803-809
- Reeves R, Nissen MS (1990) The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem* **265**: 8573-8582
- Richman TJ, Toenjes KA, Morales SE, Cole KC, Wasserman BT, Taylor CM, Koster JA, Whelihan MF, Johnson DI (2004) Analysis of cell-cycle specific localization of the

- Rdi1p RhoGDI and the structural determinants required for Cdc42p membrane localization and clustering at sites of polarized growth. *Curr Genet* **45**: 339-349
- Ridgway P, Brown KD, Rangasamy D, Svensson U, Tremethick DJ (2004) Unique residues on the H2A.Z containing nucleosome surface are important for *Xenopus laevis* development. *J Biol Chem* **279**: 43815-43820
- Robert T, Vanoli F, Chiolo I, Shubassi G, Bernstein KA, Rothstein R, Botrugno OA, Parazzoli D, Oldani A, Minucci S, Foiani M (2011) HDACs link the DNA damage response, processing of double-strand breaks and autophagy. *Nature* **471**: 74-79
- Robzyk K, Recht J, Osley MA (2000) Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* **287**: 501-504
- Romero P, Obradovic Z, Li X, Garner EC, Brown CJ, Dunker AK (2001) Sequence complexity of disordered protein. *Proteins* **42**: 38-48
- Ruthenburg AJ, Allis CD, Wysocka J (2007) Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell* **25**: 15-30
- Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition edn.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Samson RA (1994) *Current concepts of Aspergillus systematics*, In Biotechnology handbooks 7 "Aspergillus": Smith JE (ed). Plenum Press New York and London.
- Schroeckh V, Scherlach K, Nützmann HW, Shelest E, Schmidt-Heck W, Schuemann J, Martin K, Hertweck C, Brakhage AA (2009) Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 14558-14563
- Schwarz PM, Felthausen A, Fletcher TM, Hansen JC (1996) Reversible oligonucleosome self-association: dependence on divalent cations and core histone tail domains. *Biochemistry* **35**: 4009-4015
- Segal E, Fondufe-Mittendorf Y, Chen L, Thastrom A, Field Y, Moore IK, Wang JP, Widom J (2006) A genomic code for nucleosome positioning. *Nature* **442**: 772-778
- Serlupi-Crescenzi O, Kurtz MB, Champe SP (1983) Developmental defects resulting from arginine auxotrophy in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **129**: 3535-3544
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**: 850-858
- Shimada M, Niida H, Zineldeen DH, Tagami H, Tanaka M, Saito H, Nakanishi M (2008) Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell* **132**: 221-232
- Shyu YJ, Liu H, Deng X, Hu CD (2006) Identification of new fluorescent protein fragments for bimolecular fluorescence complementation analysis under physiological conditions. *Biotechniques* **40**: 61-66
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517
- Spröte P, Hynes MJ, Hortschansky P, Shelest E, Scharf DH, Wolke SM, Brakhage AA (2008) Identification of the novel penicillin biosynthesis gene *aatB* of *Aspergillus nidulans*

- and its putative evolutionary relationship to this fungal secondary metabolism gene cluster. *Mol Microbiol* **70**: 445-461
- Steidl S, Hynes MJ, Brakhage AA (2001) The *Aspergillus nidulans* multimeric CCAAT binding complex AnCF is negatively autoregulated via its *hapB* subunit gene. *J Mol Biol* **306**: 643-653
- Steidl S, Papagiannopoulos P, Litzka O, Andrianopoulos A, Davis MA, Brakhage AA, Hynes MJ (1999) AnCF, the CCAAT binding complex of *Aspergillus nidulans*, contains products of the *hapB*, *hapC*, and *hapE* genes and is required for activation by the pathway-specific regulatory gene *amdR*. *Mol Cell Biol* **19**: 99-106
- Steidl S, Tüncher A, Goda H, Guder C, Papadopoulou N, Kobayashi T, Tsukagoshi N, Kato M, Brakhage AA (2004) A single subunit of a heterotrimeric CCAAT-binding complex carries a nuclear localization signal: piggy back transport of the pre-assembled complex to the nucleus. *J Mol Biol* **342**: 515-524
- Stringer MA, Dean RA, Sewall TC, Timberlake WE (1991) Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes Dev* **5**: 1161-1171
- Sun ZW, Allis CD (2002) Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* **418**: 104-108
- Talbert PB, Henikoff S (2010) Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 264-275
- Tanaka A, Kamei K, Tanoue S, Papagiannopoulos P, Steidl S, Brakhage AA, Davis MA, Hynes MJ, Kato M, Kobayashi T, Tsukagoshi N (2001) AoHapB, AoHapC and AoHapE, subunits of the *Aspergillus oryzae* CCAAT-binding complex, are functionally interchangeable with the corresponding subunits in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **39**: 175-182
- Tanaka A, Kato M, Nagase T, Kobayashi T, Tsukagoshi N (2002) Isolation of genes encoding novel transcription factors which interact with the Hap complex from *Aspergillus species*. *Biochim Biophys Acta* **1576**: 176-182
- Tani S, Itoh T, Kato M, Kobayashi T, Tsukagoshi N (2001) *In vivo* and *in vitro* analyses of the AmyR binding site of the *Aspergillus nidulans agdA* promoter; requirement of the CGG direct repeat for induction and high affinity binding of AmyR. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**: 1568-1574
- Thakar A, Gupta P, Ishibashi T, Finn R, Silva-Moreno B, Uchiyama S, Fukui K, Tomschik M, Ausio J, Zlatanova J (2009) H2A.Z and H3.3 histone variants affect nucleosome structure: biochemical and biophysical studies. *Biochemistry* **48**: 10852-10857
- Then Bergh K, Litzka O, Brakhage AA (1996) Identification of a major *cis*-acting DNA element controlling the bidirectionally transcribed penicillin biosynthesis genes *acvA* (*pcbAB*) and *ipnA* (*pcbC*) of *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **178**: 3908-3916
- Thön M, Al-Abdallah Q, Hortschansky P, Brakhage AA (2007) The thioredoxin system of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: impact on development and oxidative stress response. *J Biol Chem* **282**: 27259-27269
- Thön M, Al Abdallah Q, Hortschansky P, Scharf DH, Eisendle M, Haas H, Brakhage AA (2010) The CCAAT-binding complex coordinates the oxidative stress response in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **38**: 1098-1113

- Tüncher A, Sprote P, Gehrke A, Brakhage AA (2005) The CCAAT-binding complex of eukaryotes: evolution of a second NLS in the HapB subunit of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* despite functional conservation at the molecular level between yeast, *A.nidulans* and human. *J Mol Biol* **352**: 517-533
- van Attikum H, Gasser SM (2009) Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol* **19**: 207-217
- van Daal A, White EM, Gorovsky MA, Elgin SC (1988) *Drosophila* has a single copy of the gene encoding a highly conserved histone H2A variant of the H2A.F/Z type. *Nucleic Acids Res* **16**: 7487-7497
- van Heeswijck R, Hynes MJ (1991) The *amdR* product and a CCAAT-binding factor bind to adjacent, possibly overlapping DNA sequences in the promoter region of the *Aspergillus nidulans amdS* gene. *Nucleic Acids Res* **19**: 2655-2660
- van Heusden GP (2009) 14-3-3 Proteins: insights from genome-wide studies in yeast. *Genomics* **94**: 287-293
- Weake VM, Workman JL (2008) Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell* **29**: 653-663
- Weidner G, Steidl S, Brakhage AA (2001) The *Aspergillus nidulans* homoaconitase gene *lysF* is negatively regulated by the multimeric CCAAT-binding complex AnCF and positively regulated by GATA sites. *Arch Microbiol* **175**: 122-132
- Weinert BT, Wagner SA, Horn H, Henriksen P, Liu WR, Olsen JV, Jensen LJ, Choudhary C (2011) Proteome-wide mapping of the *Drosophila* acetylome demonstrates a high degree of conservation of lysine acetylation. *Sci Signal* **4**: ra48
- Williamson MP (1994) The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem J* **297** (Pt 2): 249-260
- Wood A, Krogan NJ, Dover J, Schneider J, Heidt J, Boateng MA, Dean K, Golshani A, Zhang Y, Greenblatt JF, Johnston M, Shilatifard A (2003) Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol Cell* **11**: 267-274
- Worthylake DK, Prakash S, Prakash L, Hill CP (1998) Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* ubiquitin-conjugating enzyme Rad6 at 2.6 Å resolution. *J Biol Chem* **273**: 6271-6276
- Yun J, Chae HD, Choi TS, Kim EH, Bang YJ, Chung J, Choi KS, Mantovani R, Shin DY (2003) Cdk2-dependent phosphorylation of the NF-Y transcription factor and its involvement in the p53-p21 signaling pathway. *J Biol Chem* **278**: 36966-36972
- Zee BM, Garcia BA (2013) Validation of protein acetylation by mass spectrometry. *Methods Mol Biol* **981**: 1-11
- Zhang Y (2003) Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes Dev* **17**: 2733-2740
- Zlatanova J, Bishop TC, Victor JM, Jackson V, van Holde K (2009) The nucleosome family: dynamic and growing. *Structure* **17**: 160-171

ANHANG

Tabelle 9: Protein Informationen zu allen identifizierten Proteinpunkten der myzelialen Proteomkarte von *A. nidulans* Wildtyp. ^{a)} Protein-Nummer in Abbildung 24 ^{b)} Theoretische Werte ^{c)} MS Daten von MALDI-TOF/TOF ^{d)} MS/MS Daten von MALDI-TOF/TOF

Protein Nr. ^{a)}	Lokus Nummer	Protein Name	MW ^{b)} [kDa]	pI ^{b)}	PMF ^{c)} Mascot	PMF ^{c)} Anzahl der Peptide	PMF ^{c)} Sequenz Abdeckung [%]	PFF ^{d)} Mascot	PFF ^{d)} Anzahl der Peptide	PFF ^{d)} Sequenz Abdeckung [%]
1a	AN6330	elongation factor 2	93,7	6,6	156,0	26	32,6	343,6	4	7,7
1b	AN6330	elongation factor 2	93,7	6,6	144,0	26	32,9	144,0	26	32,9
1c	AN6330	elongation factor 2	93,7	6,6	58,3	7	14,2	142,1	2	3,9
2	AN4000	polyadenylate-binding protein	79,3	5,8	130,0	15	27,9	199,4	2	4,8
3	AN1047	hsp88-like protein	81,1	4,9	64,5	14	19,2			
4a	AN5747	proteasome regulatory particle subunit Rpt4	44,2	5,5	49,3	10	27,2			
4b	AN5747	proteasome regulatory particle subunit Rpt4	44,2	5,5	37,4	7	20,6			
5	AN10557	ATP-dependent RNA helicase ded1	71,2	8,8	100,0	10	20,8	182,5	3	6,1
6a	AN12473	70kDal heat shock protein	67,0	5,0	130,0	18	42,5	151,2	2	4,6
6b	AN12473	70kDal heat shock protein	67,0	5,0	111,0	13	28,8	138,5	2	4,6
7a	AN0688	transketolase 1	74,5	6,3	115,0	13	34,1			
7b	AN0688	transketolase 1	74,5	6,3	143,0	12	26,5	338,6	4	8,2
7c	AN0688	transketolase 1	74,5	6,3	121,0	19	43,1			
8	AN1429	choline oxidase	60,0	6,7	147,0	26	52,6	366,2	4	11,1
9	AN6267	vesicular-fusion protein sec17	32,9	4,8	52,8	4	20,5	57,7	1	5,1
10	AN4064	adp,ATP carrier protein	33,8	10,4	89,9	9	32,8			
11	AN2332	succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	31,3	9,0	75,4	13	32,6	70,1	1	4,4
12	AN7108	60S ribosomal protein L7	29,9	6,4	126,0	9	43,0	183,4	3	15,1
13	AN2306	ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	25,1	8,5	54,8	7	43,4	48,9	1	4,6
14	AN4916	40S ribosomal protein S7	22,8	10,8	72,2	5	33,3			

15	AN0612	conserved hypothetical protein	23,4	5,0	47,0	5	27,8			
16a	AN0163	rho-gdp dissociation inhibitor	22,3	6,1	133,0	15	72,1	162,3	2	20,8
16b	AN0163	rho-gdp dissociation inhibitor	22,3	6,1	107,0	1	8,6			
17	AN0979	40S ribosomal protein S17	16,1	10,4	98,1	8	61,2	82,8	2	18,0
18	AN6082	60S ribosomal protein L30	11,4	10,4	45,7	6	42,5	155,0	2	29,2
19	AN0907	40s ribosomal protein s22	14,6	10,3	61,3	4	46,9			
20a	AN6255	cytochrome c oxidase polypeptide VIb	10,0	9,0	71,6	4	42,9			
20b	AN6255	cytochrome c oxidase polypeptide VIb	10,0	9,0	85,7	6	61,9	83,6	1	13,1
21	AN5571	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	117,9	6,8	223,0	27	35,5	375,2	4	5,3
22	AN4288	NADH-ubiquinone oxidoreductase	81,0	6,5	106,0	11	24,0			
23a	AN9339	catalase B	79,1	4,7				151,3	3	5,0
23b	AN9339	catalase B	79,1	4,7	122,0	13	20,1			
23c	AN9339	catalase B	79,1	4,7	193,0	14	22,4	329,5	4	6,2
24	AN1639	thioredoxin	36,3	4,7	67,6	8	30,0	133,4	2	8,2
25a	AN5626	acetyl-coenzyme A synthetase	74,2	6,4	68,7	5	10,3	42,8	1	1,3
25b	AN5626	acetyl-coenzyme A synthetase	74,2	6,4	97,0	17	30,1	181,2	3	5,8
26	AN2062	glucose-regulated protein	73,7	4,6	61,3	8	17,2	149,9	2	4,5
27	AN7625	myo-inositol-1-phosphate synthase	58,3	6,3	103,0	22	41,4	240,1	4	8,7
28a	AN5127	hsp70-like protein	67,9	9,3	124,0	20	45,5	261,5	3	6,7
28b	AN5128	hsp70-like protein	68,9	3,6	145,0	14	31,7	32,5	1	2,0
28c	AN5129	hsp70-like protein	69,9	4,8	171,0	13,0	36,5	179,7	2,0	4,2
29	AN0610	voltage-gated K ⁺ channel beta subunit	38,0	8,6	49,6	7	34,6			
30a	AN4769	sulfate adenylyltransferase	63,9	7,4	140,0	12	29,3	46,4	1	3,0
30b	AN4769	sulfate adenylyltransferase	64,9	7,4	36,9	4	9,4			
30c	AN4769	sulfate adenylyltransferase	65,9	7,4	232,0	32	59,1	525,7	5	13,1
30d	AN4769	sulfate adenylyltransferase	63,9	7,4	221,0	18	45,1	72,6	1	3,0
31a	AN4464	bifunctional purine biosynthesis protein ADE16	65,0	6,8	109,0	10	22,9			
31b	AN4464	bifunctional purine biosynthesis protein ADE16	65,0	6,8	166,0	21	45,9	128,4	2	5,2
32a	AN2150	prolyl-tRNA synthetase	66,1	7,2	97,8	10	20,4			

32b	AN2150	prolyl-tRNA synthetase	66,1	7,2	157,0	23	48,1	227,4	3	8,4
33	AN5591	aminotransferase	53,7	6,0	63,5	5	14,8			
34	AN7436	disulfide-isomerase	55,8	4,3	156,0	13	36,1			
35	AN4234	N-acetylglucosamine-phosphate mutase	59,6	5,7	63,6	10	20,3			
36	AN10028	conserved hypothetical protein	56,6	8,9	55,7	9	22,7			
37	AN8233	phosphatidylinositol transfer protein sfh5	44,5	4,7	59,3	9	21,0	120,8	2	5,9
38	AN1182	tubulin beta-1 chain	50,3	4,5	67,1	11	26,6			
39a	AN0316	tubulin alpha-1 chain	50,3	4,7	66,6	10	26,7			
39b	AN0316	tubulin alpha-1 chain	50,3	4,7	44,4	9	26,1			
40a	AN7570	tubulin alpha-2 chain	50,0	4,8	66,2	11	33,3	57,9	1	3,5
40b	AN7570	tubulin alpha-2 chain	50,0	4,8	81,6	14	35,9			
41a	AN4443	cobalamin-independent methionine synthase	86,8	6,8	159,0	25	45,0	200,8	3	6,2
41b	AN4443	cobalamin-independent methionine synthase	86,8	6,8	184,0	33	50,9	332,2	4	7,6
42	AN7648	MFS transporter	57,0	9,6	52,5	5	22,0			
43a	AN5525	aconitase	84,9	6,7	67,0	10	20,6			
43b	AN5525	aconitase	84,9	6,7	94,9	17	30,0	87,9	2	7,5
44	AN2548	conserved hypothetical protein	52,9	4,9	116,0	9	28,0	263,7	3	10,2
45a	AN0554	aldehyde dehydrogenase ALDH	54,1	6,6	103,0	9	26,6			
45b	AN0554	aldehyde dehydrogenase ALDH	54,1	6,6	113,0	21	56,9	207,3	2	6,8
46a	AN2315	mitochondrial ATP synthase	55,4	5,0	197,0	18	49,2			
46b	AN2315	mitochondrial ATP synthase	55,4	5,0	208,0	22	58,3	325,5	3	8,7
47a	AN5895	secretory pathway gdp dissociation inhibitor	52,3	5,1	58,8	9	24,1			
47b	AN5895	secretory pathway gdp dissociation inhibitor	52,3	5,1	197,0	24	60,9	298,0	3	10,5
48	AN2731	mitochondrial protein import protein MAS5	45,4	6,1	75,0	8	28,4	62,6	1	4,1
49	AN2435	ATP citrate lyase subunit	53,0	6,1	127,0	11	38,6			
50a	AN3058	serine hydroxymethyltransferase	51,7	7,9	116,0	9	28,7	31,0	1	3,0
50b	AN3058	serine hydroxymethyltransferase	51,7	7,9	174,0	22	60,7	604,4	5	14,8
51	AN1990	homocitrate synthase	50,8	5,6	50,8	88,6	9,0	31,7		
52	AN8866	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	52,1	5,9	121,0	10	33,3	38,2	1	2,7

53a	AN6563	translation elongation factor eEF-1 subunit gamma	46,2	6,5	103,0	8	31,1			
53b	AN6563	translation elongation factor eEF-1 subunit gamma	46,2	6,5	157,0	20	55,0	454,0	5	16,8
54	AN4259	PCI domain-containing protein	49,8	4,6	66,8	11	32,9			
55a	AN5746	enolase	47,5	5,2	74,3	11	34,7			
55b	AN5746	enolase	47,5	5,2	117,0	16	49,5	344,7	3	12,1
55c	AN5746	enolase	47,5	5,2	232,0	30	73,1	718,2	5	19,9
56	AN0140	Arp2/3 complex subunit	47,3	6,9	112,0	10	37,3			
57	AN11035	conserved hypothetical protein	39,6	5,5	48,2	9	28,6			
58	AN1810	ornithine aminotransferase	49,1	6,0	64,6	5	19,2	73,3	1	4,2
59	AN2932	ATP-dependent RNA helicase eIF4A	47,7	4,8	81,9	20	39,9	195,5	3	7,1
60	AN9375	taurine catabolism dioxygenase TauD	44,8	6,1	52,2	11	37,8			
61	AN10156	ethanolamine kinase	47,0	5,4	122,0	10	30,5			
62	AN2682	12-oxophytodienoate reductase	46,0	5,9	142,0	11	33,3	155,0	3	9,3
63	AN7897	conserved hypothetical protein	43,1	6,4	119,0	11	30,5	57,6	1	3,1
64	AN8273	Putative ubiquinol-cytochrome-c reductase subunit	47,7	9,5	86,9	10	31,0	490,8	5	17,7
65a	AN5130	coproporphyrinogen III oxidase	52,3	8,0	68,8	7	12,1	123,0	2	4,9
65b	AN5130	coproporphyrinogen III oxidase	52,3	8,0	60,2	7	13,0	57,6	1,0	2,2
65c	AN5131	coproporphyrinogen III oxidase	53,3	7,4	95,7	15	37,4	204,6	3,0	7,8
66	AN4888	pyruvate decarboxylase	62,6	6,3	152,0	23	58,8	307,7	4	8,4
67	AN2762	glutaryl-CoA dehydrogenase	46,1	7,7	43,9	4	14,9	199,2	2	9,2
68	AN8176	60S ribosomal protein L4	40,2	11,4	110,0	8	29,8			
69	AN7169	flavoheмоprotein	44,9	6,4	123,0	9	39,8			
70a	AN5790	isocitrate dehydrogenase subunit 1	47,9	9,3	69,0	9	21,6			
70b	AN5790	isocitrate dehydrogenase subunit 1	47,9	9,3	132,0	16	45,3	296,1	4	15,0
71a	AN6525	NAD-dependent formate dehydrogenase AciA/Fdh	40,1	6,5	160,0	14	44,1	199,7	4	11,5
71b	AN6525	NAD-dependent formate dehydrogenase AciA/Fdh	40,1	6,5	127,0	18	58,1	243,4	3	12,2
72	AN5206	isocitrate dehydrogenase LysB	38,3	5,6	101,0	9	31,9	10,9	1	3,1
73a	AN4997	Sec14 cytosolic factor	36,8	5,6	110,0	9	38,8			
73b	AN4997	Sec14 cytosolic factor	36,8	5,6	92,1	12	45,9	37,8	1	4,0

74	AN5121	26S proteasome regulatory particle subunit Rpn8	39,0	5,8	80,9	6	34,4			
75a	AN2526	ketol-acid reductoisomerase	44,3	9,2	67,4	7	25,8			
75b	AN2526	ketol-acid reductoisomerase	44,3	9,2	103,0	14	40,8	393,9	3	13,0
76a	AN1993	aspartate aminotransferase	46,9	9,3	162,0	14	45,9			
76b	AN1993	aspartate aminotransferase	46,9	9,3	122,0	18	55,2	248,3	3	11,4
77	AN7146	sterol 24-C-methyltransferase	42,5	6,5	55,6	11	23,9	138,3	2	8,2
78	AN5321	cholinesterase	61,6	4,8	53,5	5	15,1			
79	AN7836	cysteine-rich secreted protein	35,7	5,2	107,0	8	37,0			
80a	AN4727	UDP-glucose 4-epimerase	40,5	6,4	86,2	6	25,6			
80b	AN4727	UDP-glucose 4-epimerase	40,5	6,4	156,0	21	73,0	312,5	2	9,8
81	AN7193	aldehyde reductase I	37,2	6,3	106,0	11	45,5	326,1	3	12,6
82	AN2286	alcohol dehydrogenase III	37,1	7,1	117,0	12	50,9	243,3	2	8,2
83	AN7893	conserved hypothetical protein	36,6	5,4	142,0	11	56,7	236,9	3	6,6
84a	AN3172	40S ribosomal protein S0	31,6	4,5	85,8	7	35,2			
84b	AN3172	40S ribosomal protein S0	31,6	4,5	86,3	7	43,7			
85	AN8979	alcohol dehydrogenase I	37,2	7,8	88,6	1	3,4			
86	AN6368	arginyl-tRNA synthetase	73,1	8,6	96,2	7	20,8			
87a	AN3581	thioredoxin reductase	36,1	5,0	112,0	8	37,8			
87b	AN3581	thioredoxin reductase	36,1	5,0	54,5	4	20,1			
87c	AN3581	thioredoxin reductase	36,1	5,0	128,0	13	63,1	368,8	3	14,9
88	AN10474	cofactor for methionyl	46,5	7,1	83,4	13	48,2	169,9	2	7,5
89a	AN8009	thiamine biosynthesis protein	38,2	5,8	79,1	11	25,8	116,5	3	7,6
89b	AN8009	thiamine biosynthesis protein	38,2	5,8	56,8	10	24,6	134,2	3	12,9
89c	AN8009	thiamine biosynthesis protein	38,2	5,8	103,0	17	49,6	164,3	2	7,6
90	AN2272	adenosine kinase	38,3	5,2	83,8	10	39,2	115,0	3	7,4
91	AN10182	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	37,4	4,5	90,0	7	27,8	64,9	1	4,3
92	AN0579	isopentenyl diphosphate isomerase	30,5	4,9	62,9	8	36,6	86,0	1	4,5
93a	AN6630	ATP synthase subunit D	22,0	4,6	53,2	6	46,8	204,7	2	13,3
93b	AN6630	ATP synthase subunit D	22,0	4,6	58,4	3	30,0			

94a	AN5563	NADP(+)-dependent glycerol dehydrogenase	37,0	6,2	69,6	6	29,8			
94b	AN5563	NADP(+)-dependent glycerol dehydrogenase	37,0	6,2	84,9	11	44,9	392,2	3	16,6
95	AN10230	5'-methylthioadenosine phosphorylase	39,5	7,1	80,9	6	20,6	186,2	3	4,7
96a	AN1013	60S ribosomal protein L5	34,4	9,1	83,2	7	42,5			
96b	AN1013	60S ribosomal protein L5	34,4	9,1	91,6	8	42,5			
96c	AN1013	60S ribosomal protein L5	34,4	9,1	143,0	15	57,5	393,3	3	14,6
97a	AN9148	UDP-glucose pyrophosphorylase	57,5	7,8	134,0	15	42,4	202,6	2	5,3
97b	AN9148	UDP-glucose pyrophosphorylase	57,5	7,8	205,0	31	65,8	666,0	5	10,1
98	AN0745	fibrillarin	32,8	11,0	149,0	11	45,7			
99a	AN6004	actin cytoskeleton protein	29,0	5,7	121,0	11	54,4			
99b	AN6004	actin cytoskeleton protein	29,0	5,7	107,0	9	46,7	264,6	3	14,8
100	AN5741	KOW domain-containing protein	42,3	9,8				153,3	2	8,8
101	AN0410	serine/threonine-protein phosphatase	37,2	5,5	58,0	5	22,3	28,5	1	4,0
102	AN4978	pre-RNA splicing factor Srp2	34,7	9,7	88,7	8	34,8	217,9	4	20,9
103	AN10675	nitrilase	31,6	7,6	167,0	10	57,3	54,9	1	6,5
104	AN2867	phosphoglucomutase	60,6	6,0	84,4	18	30,0	193,7	2	5,7
105a	AN4430	acetolactate synthase small subunit	35,9	7,0	97,6	9	36,2			
105b	AN4430	acetolactate synthase small subunit	35,9	7,0	66,4	8	30,4			
106	AN4117	conserved hypothetical protein	57,1	9,2	47,5	6	17,7			
107	AN7708	aldo-keto reductase	31,6	7,2	74,4	6	29,0			
108	AN3034	conserved hypothetical protein	34,0	4,4	67,0	4	18,8			
109a	AN2968	inorganic pyrophosphatase	32,3	5,0	76,2	10	43,2	87,9	2	3,7
109b	AN2968	inorganic pyrophosphatase	32,3	5,0	174,0	19	70,4	277,8	3	15,3
110	AN6490	purine nucleoside phosphorylase	34,6	6,6	157,0	10	49,2			
111	AN1667	conserved hypothetical protein	33,2	10,7	110,0	8	35,4			
112a	AN6717	malate dehydrogenase	35,7	9,3	139,0	9	43,2			
112b	AN6717	malate dehydrogenase	35,7	9,3	61,5	5	22,1			
112c	AN6717	malate dehydrogenase	35,7	9,3	134,0	12	45,3	194,3	3	10,6
112d	AN6717	malate dehydrogenase	35,7	9,3	163,0	18	66,5	185,2	4	14,2

113a	AN6499	malate dehydrogenase	34,2	6,6	94,3	5	34,5			
113b	AN6499	malate dehydrogenase	34,2	6,6	98,6	7	31,5	234,6	3	13,6
113c	AN6499	malate dehydrogenase	34,2	6,6	118,0	11	50,6	260,0	3	14,7
114a	AN4501	conserved hypothetical protein	29,1	4,4	90,7	6	35,6	67,5	1	4,2
114b	AN4501	conserved hypothetical protein	29,1	4,4	118,0	8	41,4	103,6	1	6,5
115a	AN1523	ATP synthase subunit alpha	60,0	9,6	160,0	24	43,9	322,7	4	10,3
115b	AN1523	ATP synthase subunit alpha	60,0	9,6	174,0	30	52,2	503,6	5	13,7
116a	AN0687	spermidine synthase	33,3	5,1	76,3	8	21,6			
116b	AN0687	spermidine synthase	33,3	5,1	116,0	13	55,8	152,7	2	8,2
117	AN5989	NAD dependent epimerase/dehydratase	29,7	6,8	97,3	7	37,5	69,0	2	9,4
118	AN10229	NADH-ubiquinone oxidoreductase 304 kDa subunit	32,8	8,7	129,0	12	51,4			
119	AN6866	chorismate mutase	30,6	5,1	65,8	5	28,1			
120	AN2930	fumarylacetoacetate hydrolase	25,7	7,4	81,0	5	32,8			
121	AN0285	6-phosphogluconolactonase	28,7	5,6	141,0	9	54,0			
122a	AN4695	woronin body major protein	19,7	7,6	83,7	7	58,2	167,0	2	18,1
122b	AN4695	woronin body major protein	19,7	7,6	136,0	13	69,2	306,3	5	35,3
122c	AN4695	woronin body major protein	19,7	7,6	75,2	5	47,5			
122d	AN4695	woronin body major protein	19,7	7,6	84,0	10	68,4	317,4	4	26,2
123	AN5884	orotate phosphoribosyltransferase	25,4	7,5	89,3	6	35,7			
124	AN10718	DMRL synthase	21,5	6,2	84,1	6	57,0			
125	AN6993	xanthine phosphoribosyltransferase 1	23,0	5,7	49,2	4	25,5			
126a	AN9465	60S ribosomal protein L9-B	21,8	10,0	130,0	15	68,8	236,4	4	28,1
126b	AN9465	60S ribosomal protein L9-B	21,8	10,0	98,1	6	49,5			
127	AN4803	40S ribosomal protein S9	22,2	10,7	63,1	5	26,9			
128a	AN6631	ATP synthase subunit D	19,5	8,9	81,6	5	49,1			
128b	AN6631	ATP synthase subunit D	19,5	8,9	85,3	7	60,7	433,5	5	32,9
128c	AN6631	ATP synthase subunit D	19,5	8,9	74,8	5	49,1			
129	AN6145	peptidyl-prolyl cis/trans isomerase	20,0	6,9	46,3	4	42,0			
130a	AN5210	pyruvate kinase	58,1	8,2	79,1	9	16,0	21,0	1	2,3

130b	AN5210	pyruvate kinase	58,1	8,2	93,7	21	32,9	212,9	3	8,0
130c	AN5210	pyruvate kinase	58,1	8,2	64,2	8	15,2			
131	AN10495	succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1	54,5	6,6	52,6	12	21,1			
132	AN3706	40S ribosomal protein S10b	17,6	10,3	74,6	4	36,6	194,0	2	18,3
133a	AN0241	superoxide dismutase	16,0	6,2	90,0	5	47,4			
133b	AN0241	superoxide dismutase	16,0	6,2	51,2	7	48,9	70,8	3	21,6
134	AN2316	cytochrome c oxidase polypeptide V	22,2	10,3	37,7	4	28,9	95,9	2	12,7
135a	AN8605	cyclophilin A	17,8	9,5	53,2	5	34,6			
135b	AN8605	cyclophilin A	17,8	9,5	69,6	8	51,9	186,5	3	27,8
136	AN3469	histone H2B	14,9	10,8	81,5	6	36,4			
137a	AN7594	DUF636 domain-containing protein	14,8	6,5	96,2	5	64,0	115,6	1	14,0
137b	AN7594	DUF636 domain-containing protein	14,8	6,5	125,0	8	75,0			
138	AN3134	T-complex protein 1 subunit gamma	58,9	6,1	117,0	28	54,6	108,9	2	5,6
139a	AN5907	ribose 5-phosphate isomerase	16,9	7,4	311,8	4	34,4			
139b	AN5907	ribose 5-phosphate isomerase	16,9	7,4	63,4	5	38,9	151,9	2	17,2
140	AN8216	nucleoside diphosphate kinase	16,9	8,5	91,1	6	47,7			
141	AN6232	vacuolar ATP synthase subunit B	56,7	5,6	196,0	18	50,5	248,8	3	8,7
142	AN7742	conserved hypothetical protein	16,9	10,3	58,7	3	33,5			
143	AN6246	cytochrome c	12,3	13,0				249,1	3	30,1
144	AN5543	Pmf1p factor 1	12,7	5,9	54,6	3	39,7			
145	AN9424	cyclin-dependent kinase regulatory subunit	17,4	10,1	50,7	4	28,1	113,0	2	15,1
146	AN7497	NADH-ubiquinone oxidoreductase 21 kDa subunit	24,9	10,1	49,8	6	33,9	84,8	1	5,9
147	AN1549	conserved hypothetical protein	9,6	10,0	65,7	4	53,5	102,4	1	14,0
148	AN4384	dihydrofolate synthetase Fol3	44,8	5,6	66,9	6	27,7			
149	AN0177	conserved hypothetical protein	8,8	9,9	55,7	4	55,1			
150	AN2432	chaperonin	11,2	9,1	72,0	5	52,4			
151	AN2918	t-complex protein 1	57,6	7,6	75,8	9	21,8	66,3	1	2,4
152	AN6287	ATP synthase oligomycin sensitivity conferral protein	23,7	10,2	52,7	6	37,9	157,3	2	11,9
153	AN12478	IMP dehydrogenase	31,8	7,2	94,6	14	56,0	235,5	2	9,6

154	AN6688	septin AspB	46,8	7,5	135,0	20	62,5	388,8	4	16,8
155	AN5629	NADH-ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit	54,4	8,1	141,0	21	51,7	344,1	3	10,5
156	AN2248	gamma-amino-n-butyrate transaminase	55,5	9,3	196,0	26	67,5	241,0	2	6,6
157	AN10745	serine hydroxymethyltransferase	66,3	9,8	83,4	9	29,7	233,3	3	2,6
158	AN7299	curved DNA-binding protein	43,8	7,9	67,5	10	34,0	275,9	2	8,4
159a	AN8275	citrate synthase citA-Aspergillus niger	52,2	8,9	88,1	16	47,7	294,4	3	9,1
159b	AN8275	citrate synthase citA-Aspergillus niger	52,2	8,9	110,0	18	49,2	316,3	3	9,1
160	AN1379	Suppressor Of NimA1	39,7	7,8	141,0	16	51,4	215,8	2	9,7
161	AN8182	septin-8	43,7	7,4	46,9	11	35,4	227,7	2	9,2
162	AN6842	mitochondrial large ribosomal subunit Yml35	48,0	10,0	62,9	10	33,0	101,1	2	5,5
163	AN0932	glutathione reductase	51,6	8,7	117,0	19	54,0	339,7	3	10,8
164	AN2225	nucleoside-diphosphate-sugar epimerase	37,4	6,7	86,3	13	47,1	175,4	3	13,7
165	AN4793	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	39,4	6,9	79,1	11	43,0	251,2	4	17,1
166	AN8277	O-acetylhomoserine (thiol)-lyase	47,3	6,5	165,0	20	70,3	203,2	2	8,9
167	AN5162	pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	45,5	8,3	105,0	19	46,9	459,7	4	16,8
168	AN1409	acetyl-CoA acetyltransferase	41,0	7,1	90,1	10	34,8	224,0	2	10,6
169a	AN3928	thiazole biosynthetic enzyme	35,6	5,4	86,2	5	27,2			
169b	AN3928	thiazole biosynthetic enzyme	35,6	5,4	86,2	5	27,2			
170a	AN6048	aspartate transaminase	48,7	7,2	180,0	21	49,7	255,7	3	8,5
170b	AN6048	aspartate transaminase	48,7	7,2	148,0	20	58,0	343,4	3	13,0
171	AN7632	formaldehyde dehydrogenase	40,0	6,7	77,8	10	35,6	234,5	2	9,0
172	AN1394	septin	38,7	8,2	178,0	20	69,6	369,4	3	14,9
173a	AN10614	telomere and ribosome associated protein Stm1	32,6	10,1	68,5	11	38,5	10,7	1	4,1
173b	AN10614	telomere and ribosome associated protein Stm1	32,6	10,1	60,2	9	35,8			
174a	AN8041	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36,3	7,6	101,0	13	61,3	155,9	2	8,0
174b	AN8041	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36,3	7,6	98,2	13	58,3	129,7	2	8,0
174c	AN8041	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36,3	7,6	116,0	14	65,8	220,7	2	9,8
175	AN8770	acetylglutamate kinase	98,6	8,3	58,5	9	13,1	207,4	2	3,2
176a	AN4087	40S ribosomal protein S3	28,9	9,3	87,4	12	40,9			

176b	AN4087	40S ribosomal protein S3	28,9	9,3	93,3	13	47,0	275,9	3	12,1
177	AN0432	NADH-cytochrome b5 reductase 2	36,1	9,1	120,0	11	40,4	370,9	4	17,7
178	AN1274	glycerol dehydrogenase Gcy1	33,4	7,0	156,0	14	62,6	106,3	2	10,1
179	AN1873	phosphoglycerate mutase	42,1	6,6	105,0	13	46,0	179,1	2	8,3
180	AN0290	F-actin-capping protein subunit beta	35,5	4,6	109,0	13	37,7	212,2	3	9,9
181	AN8054	proteasome component PRE6	27,0	8,6	60,2	6	36,2			
182a	AN4402	porin	29,9	9,5	61,5	3	35,2			
182b	AN4402	porin	29,9	9,5				92,5	2	8,5
183	AN1194	adenylylsulfate kinase	23,0	7,2	52,4	3	25,2	125,3	1	8,7
184	AN5482	GTP-binding nuclear protein GSP1/Ran	24,2	7,5	21,3	4	25,1	94,3	1	6,5
185a	AN6900	triosephosphate isomerase	27,1	5,9	108,0	7	50,6	195,1	2	12,4
185b	AN6900	triosephosphate isomerase	27,1	5,9	56,2	4	33,3			
186	AN0083	transcription initiation factor subunit	26,3	5,9	56,7	4	24,9	153,9	2	11,2
187	AN10223	mitochondrial peroxiredoxin PRX1	23,3	6,0	119,0	11	37,1	109,6	1	1,7
188	AN8049	hypothetical protein	23,4	7,6				142,5	2	17,8
189	AN10186	golgi matrix protein	57,8	4,8	70,0	10	17,8	358,0	4	6,8
190	AN10952	FAD monooxygenase	73,0	7,6				273,9	3	5,3
191	AN4073	40S ribosomal protein S12	16,4	4,7	46,1	5	28,7	41,3	1	8,7
192a	AN8216	nucleoside diphosphate kinase	16,9	8,5	91,0	11	75,2	323,6	4	28,1
192b	AN8216	nucleoside diphosphate kinase	16,9	8,5	119,0	12	75,2	330,6	4	28,1
193	AN4218	elongation factor 1-alpha	50,5	9,6	53,2	15	35,7	159,3	3	9,1
194	AN5978	conserved hypothetical protein	51,7	10,3	169,0	20	69,7			
195	AN1152	conserved hypothetical protein	18,3	5,6	60,6	5	47,0			
196	AN8692	putative peroxiredoxin pmp20	18,5	5,7	66,5	8	60,7	228,4	2	22,0
197	AN2317	cofilin	16,7	5,3	51,4	5	52,6	249,8	2	22,4
198	AN4525	cytochrome c oxidase polypeptide IV	22,0	6,2	64,3	7	47,4	153,2	2	14,9
199	AN0641	TCTP family protein	20,0	4,4	75,9	5	36,3	417,9	10	29,6
200	AN8690	DUF1690 domain-containing protein	22,9	5,1	96,0	6	44,0			
201	AN5181	nuclear movement protein nudc	22,3	5,1				38,7	1	3,0

202	AN6248	mitochondrial co-chaperone GrpE	28,6	8,7	35,1	2	9,9	118,3	2	9,9
203	AN10710	phosphomannomutase	30,6	5,0	121,0	11	40,0			
204	AN5971	NADH-ubiquinone oxidoreductase 299 kDa subunit	27,1	5,2	75,7	5	37,7	224,6	2	12,1
205	AN6064	GDSL Lipase/Acylhydrolase	28,6	5,0	49,9	3	17,5	347,0	4	28,4
206	AN6077	NADH-ubiquinone dehydrogenase 24 kDa subunit	30,0	6,3	84,4	8	24,1	62,9	3	4,8
207	AN4258	uridylate kinase Ura6	23,9	4,8	71,6	4	24,5			
208	AN3019	proteasome regulatory particle subunit	30,6	4,5	196,0	13	59,4	839,5	8	39,1
209	AN10429	phosphoserine phosphatase	29,6	4,9	72,2	7	30,7			
210	AN5872	proteasome component PUP2	26,9	4,5	164,0	11	48,4	435,0	7	32,5
211	AN6921	conserved hypothetical protein	23,4	4,1	38,8	5	24,3	109,1	2	10,5
212	AN4838	conserved hypothetical protein	23,0	5,0	29,7	2	10,6			
213	AN7742	conserved hypothetical protein	16,9	10,3	129,0	7	63,9			
214a	AN4762	conserved hypothetical protein	16,3	9,7	69,6	5	37,5			
214b	AN4762	conserved hypothetical protein	16,3	9,7	69,7	5	37,5			
215	AN6176	tubulin-specific chaperone Rbl2	13,4	5,1	16,3	1	10,2			
216	AN8118	cytochrome c oxidase polypeptide VI	17,9	5,4	26,1	2	20,4			
217	AN11146	cytidine deaminase	14,9	5,2	38,2	2	31,2			
218	AN7937	CipC-like antibiotic response protein	12,8	5,0	95,0	6	58,2			
219	AN3616	conserved hypothetical protein	12,1	5,6	33,9	2	38,2			
220	AN2989	glycine-rich RNA-binding protein	13,9	9,0	59,1	4	39,1			
221	AN3856	conserved hypothetical protein	21,7	8,1	34,9	2	21,1			
222	AN4060	ribosomal protein S16	16,4	9,4	68,1	4	37,2			
223	AN8050	UPF0047 domain-containing protein	16,2	6,7	36,0	3	34,0			
224	AN1222	S-adenosylmethionine synthetase	42,2	5,2	217,0	25	72,9	324,9	4	14,9
225	AN2873	saccharopine dehydrogenase	41,1	4,9	106,0	16	53,6	255,1	4	12,3
226	AN5602	Aha1 domain family protein	36,6	5,2	106,0	7	26,3			
227	AN6542	actin family protein	41,6	5,4	160,0	14	51,7			
228	AN6231	Tryptophan synthase	77,5	6,0	51,4	4	13,1			
229	AN10743	BAR domain-containing protein	33,3	4,8	142,0	10	52,2			

230	AN6510	mitochondrial import receptor subunit tom-40	38,2	5,0	96,5	9	23,9			
231	AN6699	electron transfer flavoprotein alpha subunit	36,4	5,5	111,0	9	33,5			
232a	AN3814	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	23,6	9,2	70,5	5	25,8			
232b	AN3814	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	23,6	9,2	55,7	6	43,6	486,0	4	36,0
233	AN1444	NADH-ubiquinone oxidoreductase 178 kDa subunit	19,4	9,6	78,1	5	38,4			
234	AN4467	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	23,8	7,9	107,0	7	32,1			
235	AN1757	proteasome component Pre9	28,2	6,3	95,7	6	41,6			
236	AN10220	cytochrome c peroxidase	39,9	9,1	140,0	10	32,1			
237	AN0252	ATP synthase subunit gamma	31,9	8,0	75,1	8	37,8	83,5	2	4,9
238	AN1907	DHHC zinc finger domain-containing protein	47,3	8,8	8,9	1	1,5			
239	AN6726	probable proteasome subunit alpha type 2	30,1	5,5	152,0	10	56,5			
240a	AN3344	GNAT family acetyltransferase	29,2	5,0	156,0	11	59,8			
240b	AN3344	GNAT family acetyltransferase	29,2	5,0	111,0	11	67,1	191,1	3	16,1
241	AN5879	phosphatidylglycerol/phosphatidylinositol transfer protein	18,3	4,6	66,0	4	21,3			
242	AN5703	NADH-ubiquinone oxidoreductase 23 kDa subunit	25,4	7,6	67,9	5	34,8			
243	AN2343	nitroreductase	23,8	5,1	61,8	4	29,8			
244	AN2976	cystathionine beta-synthase	20,2	5,9	68,4	4	22,4			
245	AN10188	guanylate kinase	25,6	8,2	78,7	5	29,8			
246	AN4457	proteasome component Pre1	22,7	6,8	34,3	4	17,7			
247	AN4869	proteasome subunit alpha type-6	27,8	6,7	145,0	10	43,7			
248	AN8674	vacuolar ATP synthase subunit E	25,9	8,8	67,7	4	22,1			
249	AN9083	adenine phosphoribosyltransferase 1	22,9	6,4	97,4	5	41,6			
250	AN8664	dienelactone hydrolase	27,6	6,9	69,7	5	24,6			
251	AN6976	NADH-ubiquinone oxidoreductase 21 kDa subunit	20,9	9,3	90,9	5	36,0			
252	AN2260	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit	16,1	9,9	74,5	6	42,6			
253	AN5014	60S ribosomal protein L22	14,1	10,0	49,2	3	26,6			
254	AN4388	ubiquinol-cytochrome c reductase complex protein	14,5	9,0	62,1	5	46,0			
255	AN5111	zinc knuckle domain-containing protein	18,1	8,2	131,0	8	60,2			
256	AN4300	NADH-ubiquinone oxidoreductase 21.3 kDa subunit	20,9	9,4	55,9	4	24,0			

257	AN0843	40S ribosomal protein S5	23,9	9,4	135,0	8	49,8			
258	AN8346	Sulfide:quinone oxidoreductase	48,0	9,6	149,0	10	37,8			
259	AN5731	chorismate synthase	44,0	6,8	129,0	9	30,2			
260a	AN4163	G-protein complex beta subunit CpcB	35,0	6,8	149,0	10	46,5			
260b	AN4163	G-protein complex beta subunit CpcB	35,0	6,8	143,0	9	46,5			
260c	AN4163	G-protein complex beta subunit CpcB	35,0	6,8	156,0	18	80,1	312,2	3	13,0
261	AN2875	fructose-bisphosphate aldolase	39,5	6,0	112,0	8	35,8			
262	AN7484	conserved hypothetical protein	22,1	4,8	97,1	6	49,0			
263a	AN5577	manganese superoxide dismutase	24,5	9,2	42,8	4	16,1			
263b	AN5577	manganese superoxide dismutase	24,5	9,2	26,8	2	18,4	74,5	1	14,3
264	AN10987	F-box domain-containing protein	24,0	8,4	33,0	2	19,4			
265	AN7938	sugar transporter	62,0	6,1	28,6	2	6,1			
266	AN1923	alanine aminotransferase	61,0	7,4	60,1	5	9,0			
267	AN0465	40S ribosomal protein S8e	22,8	11,7	55,6	4	28,9			
268	AN7725	pyridoxine biosynthesis protein	32,3	6,3	58,8	5	17,4			
269	AN10765	eukaryotic translation initiation factor 3	31,5	9,2	83,5	7	26,6			
270	AN5744	14-3-3 family protein	30,6	4,5	70,2	4	24,4	218,8	3	13,9
271	AN3147	glycolipid transfer protein HET-C2	22,6	7,0	56,8	5	23,0			
272	AN5480	conserved hypothetical protein	13,1	6,3	59,8	3	34,5			
273	AN2903	pepsinogen	42,8	4,6	71,8	5	22,8			
274	AN8953	alpha-glucosidase B	107,5	4,9	42,9	3	6,2	269,4	4	5,5
275	AN3687	AhpC/TSA family protein	19,6	9,8	52,4	6	49,5	288,1	2	19,1
276	AN8746	nascent polypeptide-associated complex subunit beta	18,2	11,8	48,7	5	53,3	99,7	1	11,5
277	AN8080	putative peroxiredoxin pmp20	17,8	5,7	24,6	4	43,1	101,1	1	7,2
278	AN9403	pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit PdbA	39,2	7,3	44,9	7	25,5	181,7	2	6,6
279	AN5793	proteasome component C1	31,8	4,9	75,7	7	33,9	87,1	1	4,7
280	AN1162	elongation factor 1-beta	24,9	4,2	85,3	10	69,3	397,2	3	23,7
281	AN2126	F-actin-capping protein subunit alpha	30,3	8,1	76,6	7	35,8	242,9	2	8,1
282	AN1769	bisphosphate-3'-nucleotidase	44,6	5,8	191,0	3	11,5			

283	AN4956	acetolactate synthase	75,3	8,7	112,0	12	24,5			
284	AN2815	mannitol dehydrogenase	56,5	6,6	143,0	21	44,0	402,9	5	13,3
285	AN12465	dihydrolipoamide dehydrogenase	54,6	7,7	114,0	11	32,5	126,8	1	3,3
286a	AN3112	UDP-galactopyranose mutase	59,4	7,0	175,0	25	43,0	271,0	4	8,8
286b	AN3112	UDP-galactopyranose mutase	59,4	7,0	75,5	19	34,8			
287	AN6037	glucose-6-phosphate isomerase	61,3	6,4	162,0	26	55,0	108,8	2	4,9
288	AN2904	26s protease regulatory subunit 6b	47,1	5,0	95,8	15	48,1	114,6	2	5,8
289	AN5601	saccharopine dehydrogenase	49,5	5,8	118,0	19	52,2	124,5	2	6,4
290	AN10351	aspartyl aminopeptidase	54,0	5,9	148,0	23	50,3	166,5	2	4,0
291	AN10296	FAD dependent oxidoreductase	51,9	6,1	168,0	23	63,4	319,0	4	6,4
292	AN1246	phosphoglycerate kinase	44,9	6,8	94,0	7	26,1	347,9	4	15,7
293	AN8639	synthase subunit of trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex	53,3	6,1	53,4	5	18,4			
294	AN3954	6-phosphogluconate dehydrogenase	54,0	6,2	142,0	21	51,1	184,4	5	12,7
295a	AN4376	nadp-specific glutamate dehydrogenase	49,6	6,4	128,0	13	39,2	216,3	2	6,3
295b	AN4376	nadp-specific glutamate dehydrogenase	49,6	6,4	145,0	14	45,5	251,2	3	10,0
296	AN4667	septin	43,1	4,7	90,1	12	48,0	220,7	3	10,8
297	AN1263	S-adenosylhomocysteine hydrolase	48,8	6,4	91,0	13	29,2	37,9	2	5,1
298	AN0747	mitochondrial processing peptidase beta subunit	53,2	5,7	67,5	6	21,1			
299	AN1662	DUF757 domain protein	18,2	5,1	21,8	2	17,0			
300	AN1270	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 3	41,1	6,3	30,2	9	24,0	84,9	2	6,0
301	AN10512	acetyl-CoA-acetyltransferase	46,3	9,0	71,6	14	37,2			
302	AN1222	S-adenosylmethionine synthetase	42,2	5,2	130,0	17	48,7	121,6	2	7,0
303a	AN5975	mannitol-1-phosphate dehydrogenase	43,1	6,1	149,0	10	39,1			
303b	AN5975	mannitol-1-phosphate dehydrogenase	43,1	6,1	156,0	18	57,0	75,5	1	3,1
304a	AN6010	hsp7-like protein	72,3	5,8	106,0	18	34,1	152,7	3	6,6
304b	AN6010	hsp7-like protein	73,3	5,8	99,8	10	22,5	86,9	1	2,3
305	AN6089	hsp60-like protein	61,8	5,3	93,7	20	38,3	85,8	1	3,1
306	AN3059	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	57,2	5,2	151,0	25	62,5	220,0	3	8,1

307	AN3031	threonine synthase	59,0	5,3	40,5	4	13,5	358,2	4	14,3
308	AN7430	imidazole glycerol phosphate synthase hisHF	60,3	5,4	119,0	19	47,2	75,1	1	2,9
309	AN8689	glucokinase	53,7	5,4	152,0	22	57,9	318,1	3	10,2
310	AN3466	dihydrolipoamide succinyltransferase	50,6	9,2	68,1	9	18,1	27,9	1	3,0
311	AN1380	uncharacterized protein	73,2	6,7	179,0	16	36,2	230,2	3	6,7
312	AN8269	heat shock protein 90	79,8	4,6	81,6	10	21,0	84,6	2	3,3
313	AN4583	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	41,0	5,5	100,0	8	37,4	128,5	1	3,8
314	AN4159	glutamine synthetase	40,0	6,0	75,7	10	37,8	291,4	3	15,4
315	AN2916	hypothetical protein similar to succinate dehydrogenase flavoprotein subunit A	69,4	6,9	181,0	22	47,2	69,6	2	4,3
316	AN6168	hypothetical protein similar to NADP-dependent malic enzyme	71,8	7,5	120,0	18	30,9	111,4	2	5,1
317	AN3626	phosphoribosyl-aminoimidazole carboxylase	61,4	6,7	121,0	18	40,6	408,0	5	14,9
318	AN0084	Ran-specific GTPase-activating protein 1	27,3	4,6	55,9	6	33,9	218,8	2	12,8
319	AN4127	hypothetical protein	25,4	5,0	54,4	4	38,5			
320	AN0354	hypothetical protein similar to phe-inhibited DAHP synthase	40,4	7,1	69,4	10	38,5	31,8	1	2,7
321	AN10440	NADH-ubiquinone oxidoreductase 39 kDa subunit	43,6	8,7	153,0	22	72,8			
322	AN2208	conserved expressed oxidoreductase	40,1	7,1	220,0	20	64,4	271,9	3	12,8
323	AN2964	probable mitochondrial E3-binding protein of the pyruvate dehydrogenase complex	31,7	9,6	87,1	9	52,0	224,4	3	17,9
324	AN3411	cap binding protein	28,4	6,5	148,8	2	13,4			
325	AN4923	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	50,8	6,2	110,0	11	39,4	111,4	2	5,9
326	AN8707	fumarate hydratase, putative	58,5	9,4	98,1	14	40,3	147,0	2	6,1

LISTE DER WISSENSCHAFTLICHEN PUBLIKATIONEN UND VORTRÄGE

Schriftliche Veröffentlichungen

Gsaller F, Hortschansky P, Beattie SR, Klamme V, **Tuppatsch K**, Lechner BE, Rietzschel N, Werner ER, Vogan AA, Chung D, Mühlenhoff U, Kato M, Cramer RA, Brakhage AA & Haas H (2014)

The Janus transcription factor HapX controls fungal adaptation to both iron starvation and iron excess.

EMBO J. [Epub ahead of print]

Tuppatsch K, Krüger T, Hortschansky P, Brakhage AA

Identification of the novel CCAAT-binding complex subunit HapY from *Aspergillus nidulans*
In Vorbereitung.

Hortschansky P, Ando E, **Tuppatsch K**, Arikawa T, Kobayashi T, Kato M & Brakhage AA

Deciphering the DNA-binding code of the multicomponent iron-regulatory transcription factor complex CBC/HapX.

eingereicht.

Tagungsbeiträge

Tuppatsch K., Hortschansky P., Brakhage A.A. (2011), Poster

NADPH oxidase (Nox) as source of endogenous reactive oxygen species (ROS) in *Aspergillus nidulans*

VAAM-Jahrestagung 2011

Tuppatsch K., Hortschansky P., Brakhage A.A. (2011), Vortrag

Proteome analysis of *Aspergillus nidulans* *noxA*, *noxR* and *hapC* deletion strains revealed differentially abundant proteins

1. DFG-CONACyT Research Unit 1334, Karlsruhe

Tuppatsch K., Kniemeyer O., Hortschansky P., Brakhage A.A. (2011), Poster

Two-dimensional proteome reference map for the model organism *Aspergillus nidulans*

10. VAAM-Symposium „Molecular Biology of Fungi“, Marburg

Tuppatsch K., Hortschansky P., Brakhage A.A. (2011), Vortrag

Redox Regulation, Entwicklung und Hyphenwachstum in *Aspergillus nidulans*

Wissenschaftstage der Hochschule Lausitz (FH), Senftenberg

Tuppatsch K., Kniemeyer O., Hortschansky P., Brakhage A.A. (2012), Poster

A proteome reference map of *Aspergillus nidulans* and new putative targets of the AnCF complex

Satellitensymposium 9th International *Aspergillus* Meeting (Asperfest), Marburg

Brunsch M., **Tuppatsch K.**, Brakhage A.A., Kothe E. (2012), Poster
Protein map of cytosolic proteins of the Agaricomycete *Schizophyllum commune*.
ECFG11, Marburg

Tuppatsch K., Hortschansky P., Brakhage A.A. (2012), Vortrag
Redox regulation, development and hyphal growth in *Aspergillus nidulans*
2. DFG-CONACyT Research Unit 1334, Mexiko City

Tuppatsch K., Kniemeyer O., Hortschansky P., Brakhage A.A. (2012), Poster
A proteome reference map of *Aspergillus nidulans* and new putative targets of the AnCF
complex
VAAM-Jahrestagung 2012

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Katja Tuppatsch
Geboren: 15.07.1985 in Hoyerswerda

Schulischer und wissenschaftlicher Werdegang

- seit 07/2010 Promotion**
Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie
(Hans-Knöll-Institut), Jena, Arbeitsgruppe: Molekulare und
Angewandte Mikrobiologie, betreut von Prof. Dr. Axel A. Brakhage
Thema: „Assoziierte Proteine und regulatorische Funktionen des
CCAAT-Bindekomplexes in *Aspergillus nidulans*“
- 04/2010 Master of Science, Biotechnologie**
- 04/2009-11/2009 Masterarbeit**
Universität Leiden, Abteilung Molekulare Mikrobiologie und
Biotechnologie, Leiden, Niederlande,
betreut von Prof. Dr. C C.A.M.J.J. van den Hondel (Kees)
Thema: “Bottlenecks in heterologous laccase production by *Aspergillus
niger*”
- 02/2008 Bachelor of Science, Biotechnologie**
- 08/2007-01/2008 Bachelorarbeit**
Technische Universität Dresden, Abteilung Allgemeine Biochemie,
Dresden, betreut von Prof. Dr. Karl-Heinz van Pée
Thema: “Reinigung und Charakterisierung einer Manganperoxidase aus
dem Weißfäulepilz *Bjerkandera adusta* BC 04/5”
- 09/2004-04/2010 Studium der Biotechnologie, Hochschule Lausitz (FH), Senftenberg**
- 07/2004 Abitur**
- 08/2002-07/2004 Lessing-Gymnasium Hoyerswerda**

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt...

...meinem Doktorvater Prof. Dr. Axel Brakhage für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe dieses interessante Thema zu bearbeiten. Außerdem danke ich ihm für sein entgegengebrachtes Vertrauen und die mir gebotene experimentelle Freiheit.

...meinem Arbeitsgruppenleiter Dr. Peter Hortschansky für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die Korrekturen. Weiterhin möchte ich mich für die guten Ratschläge und die praktische Hilfe bedanken.

...den Gutachtern für die Betrachtung und Bewertung dieser Arbeit.

...meinen Kollegen der Abteilung MAM für die angenehme Arbeitsatmosphäre und ständige Hilfsbereitschaft. Insbesondere möchte ich mich bei Sylke Fricke, Kristin Kroll, Vera Pätz, Sophia Keller, Juliane Macheleid und Clara Baldin bedanken, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und für die vielen schönen gemeinsamen Momente.

...meinen Freunden für Motivation, Aufheiterung und besonders für Ihr Verständnis, dass ich mich stets rar gemacht habe.

...meinen Eltern, sowie meiner Schwester und meiner Oma, die mir stets liebevoll und unterstützend zur Seite standen und immer aufmunternde Worte parat hatten.

...meinem Freund Mirko, der in den letzten 12 Jahren in allen Lebenssituationen für mich da war, an mich geglaubt und mich immer unterstützt hat.

EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Ich habe die vorliegende Dissertation eigenhändig verfasst und dabei weder Textabschnitte aus einer eigenen Prüfungsarbeit oder von dritten ohne Kennzeichnung übernommen. Die von mir verwendeten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen sind in der Arbeit gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung von Material sowie bei der Herstellung des Manuskripts haben mich keine anderen, als die in der Danksagung erwähnten Personen unterstützt. Personen, die an der Anfertigung von Publikationen beteiligt waren, sind in der Publikationsliste angegeben.

Die Hilfe eines Promotionsberaters habe ich nicht in Anspruch genommen. Ebenso wenig haben Dritte von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Ich habe die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Außerdem habe ich weder die gleiche, noch eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den _____

Katja Tuppatsch